

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Caractérisation de la cicatrice gliale dans un modèle de compression médullaire : focus sur l'acide hyaluronique

Halloin, Nicolas

*Award date:*  
2016

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**Université de Namur**  
**Faculté des Sciences**

**CARACTERISATION DE LA CICATRICE GLIALE DANS UN MODELE DE  
COMPRESSION MEDULLAIRE MURIN :  
FOCUS SUR L'ACIDE HYALURONIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Nicolas HALLOIN

Janvier 2016

## Table des matières

<u>Résumé</u>	3
<u>Remerciements</u>	4
<b>1. <u>Introduction</u></b>	<b>5</b>
1.1) <u>La moelle épinière : composition et organisation</u>	5
1.2) <u>La matrice extracellulaire du SNC</u>	8
1.3) <u>L'acide hyaluronique</u>	10
1.3.1) <u>Description</u>	10
1.3.2) <u>Métabolisme</u>	10
1.3.3) <u>Rôles</u>	12
1.3.4) <u>L'HA dans le SNC</u>	13
1.4) <u>Les traumatismes médullaires</u>	14
1.4.1) <u>Contexte épidémiologique</u>	14
1.4.2) <u>Evolution de la MEC et cicatrisation après une lésion médullaire</u>	14
1.5) <u>But du travail</u>	15
<b>2. <u>Matériel et méthodes</u></b>	<b>16</b>
2.1) <u>Le modèle murin de traumatisme médullaire compressif</u>	16
2.2) <u>Evaluations des performances motrices</u>	17
2.2.1) <u>Cylindre en rotation : le Rotarod</u>	17
2.2.2) <u>La force de préhension : le Grip strength</u>	18
2.2.3) <u>Test de suspension : le Hanging wire</u>	18
2.2.4) <u>La Basso-Mouse-Scale</u>	18
2.3) <u>Processing des tissus</u>	18
2.4) <u>Histologie : coloration Eriochrome C / Crésyl violet</u>	19
2.5) <u>Immuno-histochimie</u>	20
2.6) <u>Double immunofluorescence : HA/GFAP ou HA/Iba1</u>	22
2.7) <u>Etude d'expression génique des HA synthases et hyaluronidases</u>	22
2.7.1) <u>Extraction d'ARN total</u>	22
2.7.2) <u>Reverse Transcription</u>	23

2.7.3)	<u>PCR quantitative</u>	24
2.8)	<u>Dosage du contenu intramédullaire en HA</u>	25
2.8.1)	<u>Préparation des échantillons</u>	25
2.8.2)	<u>Dosage de l'HA en sandwich sur mini-plaque</u>	25
2.9)	<u>Dosage de l'HA dans des cultures astrocytaires</u>	26
2.9.1)	<u>Culture d'astrocytes à partir de précurseurs gliaux</u>	26
2.9.2)	<u>Double immunofluorescence GFAP/A2B5</u>	27
2.9.3)	<u>Dosage du relargage d'HA dans le milieu extracellulaire</u>	28
2.10)	<u>Statistiques</u>	28
3.	<u>Résultats</u>	29
3.0)	<u>Mise au point du modèle de traumatisme médullaire</u>	29
3.1)	<u>Caractérisation fonctionnelle</u>	29
3.2)	<u>Caractérisation morphologique</u>	30
3.3)	<u>Caractérisation de la cicatrice gliale</u>	32
3.4)	<u>Distribution tissulaire de l'HA au sein de la moelle épinière</u>	34
3.5)	<u>Contenu intramédullaire en HA</u>	36
3.6)	<u>Profil d'expression des HA synthases et hyaluronidases</u>	37
3.7)	<u>Etude de la production <i>in vitro</i> d'HA par des astrocytes</u>	38
4.	<u>Conclusion, discussion et perspectives</u>	39
5.	<u>Bibliographie</u>	47

## **Caractérisation de la cicatrice gliale dans un modèle de compression médullaire murin : focus sur l'acide hyaluronique**

HALLOIN Nicolas

### Résumé

Environ 2,5 millions de personnes souffrent d'une lésion de la moelle épinière à travers le monde. Malheureusement, ces patients ne peuvent espérer qu'une amélioration minime des pertes fonctionnelles liées aux destructions tissulaires nerveuses irréversibles. Les recherches entreprises dans ce domaine de l'évolution de la lésion médullaire visent à mieux comprendre les processus de cicatrisation de ce tissu qui mettent à mal la repousse axonale, et tentent d'identifier de nouvelles voies de traitements.

Notre travail s'inscrit dans ce domaine de recherche en étudiant l'évolution de la matrice extracellulaire nerveuse après une compression médullaire en se focalisant sur l'un de ses composés : l'acide hyaluronique (HA). Nous avons donc entrepris d'étudier sa localisation, de mesurer sa concentration et d'étudier le profil d'expression génique des enzymes intervenant dans son métabolisme dans un contexte normal et lésionnel. Plusieurs études des performances physiques des souris traumatisées ont tout d'abord démontré l'étonnante capacité de récupération de ces animaux, ce qui montre l'intérêt d'investiguer leur cicatrisation médullaire favorable au retour des capacités motrices après paralysie. Après l'analyse de nos résultats, une dégradation de l'HA dans l'épicentre de la lésion médullaire était constatée ainsi qu'une redistribution de la molécule au sein de la moelle épinière lésée. L'HA disparaissait des centres de lésion et semblait s'accumuler autour de ces derniers, participant probablement à la formation de la cicatrice gliale. Cette redistribution d'HA s'accompagnait d'une forte augmentation du nombre de cellules gliales mais également d'une modification du profil d'expression génique de la hyaluronidase 1 à 2 semaines et de l'HA synthase 1 à 2 et 6 semaines post-traumatisme. L'ensemble des résultats montre donc une perturbation de la répartition de l'HA au sein de la moelle épinière après trauma, une modification de l'expression de ses enzymes ainsi que sa participation potentielle à la cicatrice gliale. Ces informations nous poussent à d'avantage investiguer ce domaine qui pourrait améliorer nos connaissances sur cette cicatrisation médullaire.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

**Promoteur:** C. Nicaise

## **Remerciements**

Je voudrais tout d'abord remercier Monsieur Charles Nicaise, mon promoteur, de m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein de son laboratoire, merci pour tout ce que j'y ai appris, merci pour son travail, son bon accueil, sa bonne humeur et sa gentillesse. Je remercie également Monsieur Yves Poumay, notre doyen et chef de notre laboratoire frère qui fut un modèle pour moi durant toute la durée de mes études.

Je voudrais remercier chaleureusement Joanna Bouchat, Kathleen De Swert et Benoît Balau pour tout ce qu'ils m'ont appris, pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie, les bons conseils qu'ils m'ont donnés lors de mes travaux ainsi que pour leur amitié.

Merci à mes co-mémorants Mika, Gwendo et Maureen pour leur soutien, leur solidarité, une amitié et une complicité qui nous ont unis pendant ces 10 mois passés ensemble.

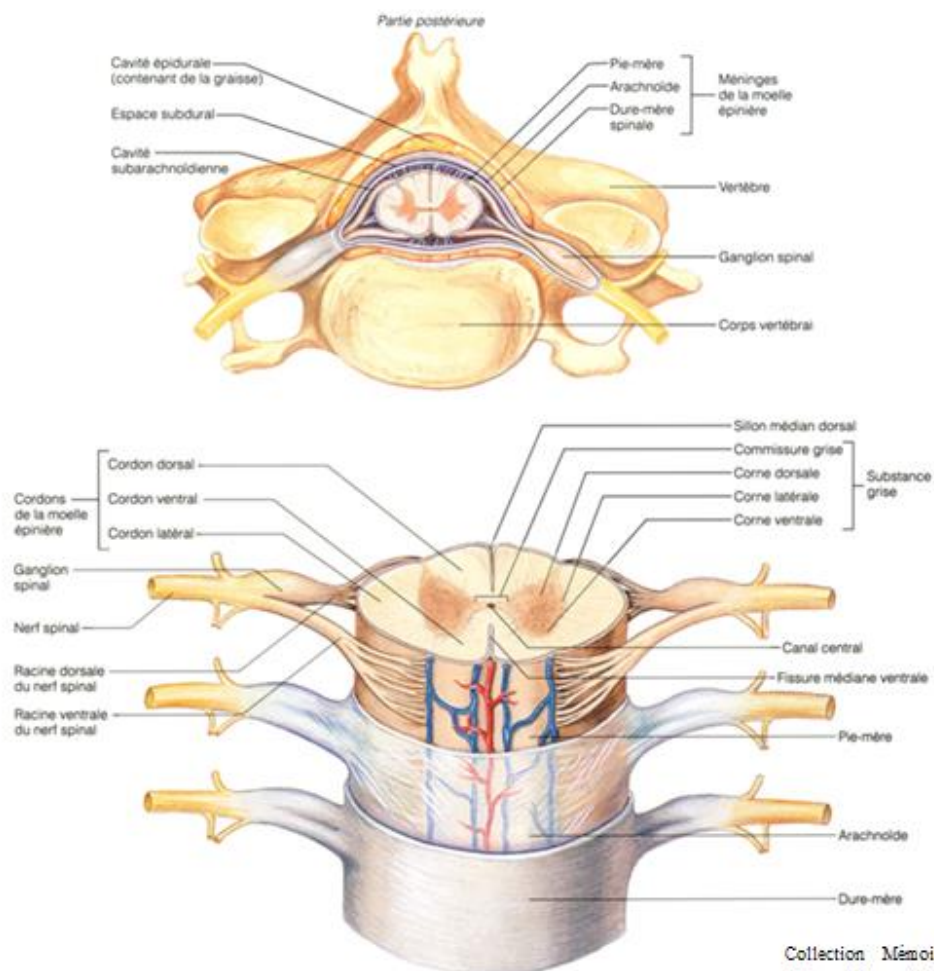
La réussite d'un mémoire dépend évidemment d'un bon cadre de travail mais aussi d'une bonne ambiance de groupe et celle-ci fut réellement formidable au 5<sup>ème</sup> étage de l'URPhyM, je remercie donc tous les membres du LabCeTi et du LNR : Aurélie (mon petit fromage), Caroline, Catherine, Céline (merci pour ton soutien et tes conseils), Emilie (merci pour la soupe), Evelyne (vive les pompiers !), Valérie, Abdallah (pour magouiller et trouver des articles il n'y en a pas deux comme toi !), Daniel, Jérémy (merci pour tes précieux conseils), Patrick, sans oublier Joanna (mon âme sœur de conneries et de délires), Kathleen (ma maman de labo qui a pris soin de moi <3) et Benoît (... et Benoît). Cette expérience m'a donné l'envie de continuer dans le domaine de la recherche et de réaliser une thèse. Si cette opportunité m'est offerte, j'aimerais que ce soit avec vous, vous êtes une équipe formidable.

Je tiens à remercier Monsieur Bruno Flamion et son équipe pour l'aide matériel et logistique apportée ainsi que pour les nombreux coups de main et conseils, je remercie plus particulièrement Martine Albert, Sophie Dogne, Delphine del Marmol et Jean-François Gaussin.

Je voudrais remercier Vanessa Colombaro de m'avoir fourni des séquences de primers utilisés pour les qPCR.

Je voudrais également remercier Claire Diederich et Guy Houbeau pour leurs conseils en expérimentation animale.

Enfin merci à tous mes collègues BBMC, nous avons formé une grande famille très soudée !



Collection Mémoires et thèses électroniques,  
Université Laval, Canada, Benoît Barrette (2008)

**Image 1 :** Représentation de la moelle épinière et des racines nerveuses ventrales et dorsales ainsi que des tissus environnants.

# **1. Introduction**

## **1.1) La moelle épinière: composition et organisation**

La moelle épinière forme avec le cerveau et le tronc cérébral le système nerveux central (SNC). Il s'agit d'un organe capital permettant le transit des fibres nerveuses descendantes et ascendantes mettant ainsi en communication le cerveau avec l'ensemble des tissus et organes du corps ; les informations véhiculées par la moelle sont de plusieurs ordres : effectrices (fonctions autonomes), motrices ou sensibles (1). La moelle épinière est protégée par les méninges (la dure-mère (pachyméninge), l'arachnoïde et la pie-mère (leptoméninge)), le tout étant englobé au sein des corps vertébraux (2). Les méninges, situées au contact de l'os, constituent une enveloppe non-osseuse protégeant le SNC (2). (image 1)

Tout le long de la colonne vertébrale, les nerfs sensitifs reviennent à la moelle épinière via les racines dorsales pour transmettre les informations nerveuses venant de la périphérie vers le cerveau tandis que les nerfs moteurs sortent de cette moelle épinière au niveau des racines ventrales et se projettent vers les muscles périphériques (1). (image 1)

D'un point de vue architectural, la moelle épinière s'organise en deux parties : au centre la substance grise qui au niveau de sa forme rappelle celle d'un papillon, et la substance blanche, de forme ovale qui entoure la précédente. (image 1)

La substance grise comprend en son centre le canal céphalo-rachidien (ou canal épendymaire), canal contenant le liquide du même nom qui est un liquide protecteur et nourricier du SNC (3, 4). Ce dernier est un liquide clair, sécrété en grande partie (70%) dans les plexus choroïdes situés dans la paroi des ventricules latéraux ainsi que le fond des troisième et quatrième ventricules (4). Les 30 autres pourcents proviennent des lits capillaires du cerveau ainsi que de la production métabolique d'eau (4). Ce liquide est très pauvre en glucides, protéines et potassium mais riche en sodium et chlore (4). Il agit comme protecteur du SNC, lui servant d'amortisseur pour le protéger d'éventuels chocs traumatiques (4). Son rôle est malgré tout plus vaste que ça, en effet il va également récupérer et évacuer les déchets du métabolisme neuronal, des médicaments et d'autres substances diffusant du sang vers le SNC, il va aussi fortement influencer le microenvironnement des neurones et des cellules gliales (4).

Autour du canal céphalo-rachidien s'étend le tissu de la substance grise virtuellement divisé en deux zones : les cornes ventrales et les cornes dorsales. La première comprend la zone où l'on trouve des corps cellulaires des neurones moteurs et leurs prolongements axonaux qui suivent un trajet descendant (c'est à dire depuis le cerveau vers la périphérie). La deuxième contient des corps cellulaires des neurones sensitifs et des fibres sensibles ascendantes venant de la périphérie et remontant vers le cerveau (image 1). Cette substance grise de la moelle épinière renferme toutes les synapses du tissu (3). Elle contient les corps cellulaires des neurones transitant dans le SNC ainsi que les parties proximales de leurs prolongements (axones et dendrites) (3). Le corps cellulaire neuronal est appelé péricaryon et comprend le noyau ainsi que divers organites impliqués dans des activités métaboliques élevées (3). Ainsi, le noyau présente un nucléoplasme à l'aspect clair, suggérant une grande proportion d'euchromatine, donc une chromatine accessible pour une transcription très active (3). On retrouve également un riche réticulum endoplasmique rugueux (RER) appelé dans ces cellules les blocs de Nissl, un appareil de Golgi développé, disposé en couronne autour du noyau et de nombreuses mitochondries et lysosomes (3).



Ces caractéristiques montrent que ces cellules sont marquées par une production importante de protéines (exemple : protéines du cytosquelette, pompes ioniques, récepteurs synaptiques, moteurs moléculaires), un fort besoin énergétique ainsi que la nécessité de renouveler constamment ses composants cellulaires notamment membranaires (3). De ce péricaryon vont émerger les prolongements du neurone (image 2). Tout d'abord un prolongement unique appelé axone qui émerge du cône d'implantation et transmet les informations nerveuses vers une cible au niveau des communications nerveuses à l'aide de boutons synaptiques (3). L'axone est pourvu d'un réseau complexe de microtubules et de neurofilaments sur lequel se font des transports rétrogrades (recyclage des organelles) et antérogrades (transport de récepteurs et neurotransmetteurs) (1). Comme cité précédemment, on retrouve également des dendrites, généralement multiples, qui transmettent des informations nerveuses vers le péricaryon (3). Ces prolongements sont souvent beaucoup plus courts que le précédent (3). Ces neurones peuvent atteindre des gammes de tailles très variables de plusieurs micromètres à des dizaines de centimètres (1, 3).

La substance blanche, quant à elle, est traversée par les prolongements axonaux des neurones regroupés sous forme de tractus de fibres descendantes ou ascendantes, elle est donc responsable de la conduction des influx nerveux. Elle tire son nom de la couleur que lui donne la myéline, substance essentiellement lipidique fournie par des replis membranaires de cellules gliales particulières : les oligodendrocytes (3).

D'autres types cellulaires que les neurones se rencontrent dans la moelle épinière, ce sont les cellules de la névroglie (3). Il s'agit de cellules non-neurales qui possèdent un rôle de soutien, de nutrition et de défense (3). Cette névroglie se divise en une névroglie épithéliale et une névroglie interstitielle, elle-même séparée en macroglie et microglie (3).

La névroglie épithéliale est formée de cellules organisées en une assise de cellules gliales juxtaposées comme un épithélium simple (3). Dans la moelle épinière ces cellules bordent le canal de l'épendyme d'où leur nom d'épendymocytes et contrôlent les échanges entre le liquide céphalo-rachidien et les cellules du SNC (3).

La macroglie, d'origine ectodermique, comprend les astrocytes et les oligodendrocytes. Les astrocytes sont doués de capacités de multiplications, et particulièrement après une lésion du tissu pour former ce qu'on appelle la cicatrice gliale (3).

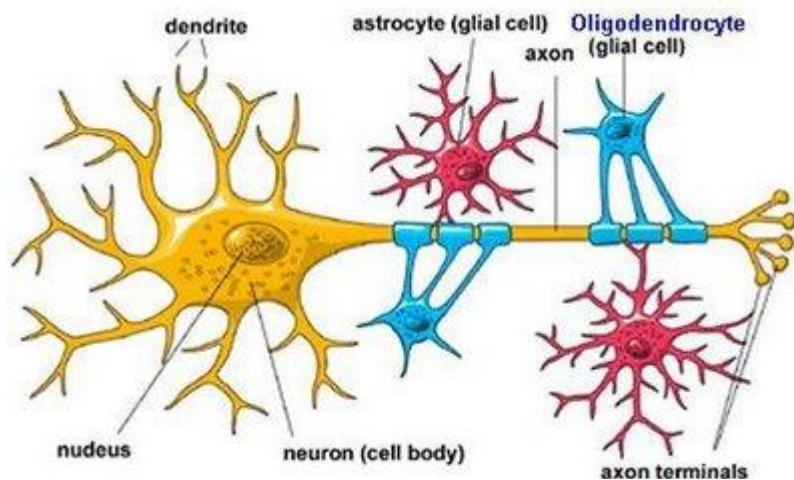
Les astrocytes sont des cellules gliales de forme étoilée dont les prolongements fins et ramifiés se prolongent soit jusqu'à un corps cellulaire-voisin (astrocyte, oligodendrocyte, neurone) entrant alors en contact avec lui, soit vers les capillaires sanguins pour former un pied vasculaire ou encore vers la surface externe du SNC pour entrer dans la formation de la membrane limitante gliale, barrière disposée entre le système nerveux et les méninges (3). Bien que la littérature scientifique rende de plus en plus compte d'une large hétérogénéité astrocytaire au travers du SNC, deux types d'astrocytes ont été historiquement décrits (3). Les astrocytes protoplasmiques, pauvres en filaments gliaux, aux prolongements longs et épais, localisés principalement dans la substance grise (3). Deuxièmement, les astrocytes fibreux, surtout présents dans la substance blanche, riches en filaments intermédiaires gliaux, munis de longs et fins prolongements peu ramifiés (3). Les astrocytes détiennent divers rôles :

- Ils servent de guides durant le développement embryonnaire pour les neurones en migration (3)
- Ils détiennent un rôle mécanique dans le support structural du tissu nerveux (3)
- Ils interviennent dans la nutrition des cellules nerveuses via une structure appelée l'unité angio-glio-neurale. En effet, les astrocytes émettent des prolongements

cytoplasmiques d'une part vers les vaisseaux sanguins voisins et d'autre part vers les cellules nerveuses permettant ainsi de transmettre des nutriments captés dans la circulation à ces dernières. Notons que ce transport peut-être emprunté dans le sens inverse pour éliminer divers déchets provenant des neurones (3)

- Ils ont une fonction réparatrice en sécrétant une cicatrice gliale et en proliférant après l'apparition d'une lésion tissulaire (1, 3)
- Ils participent à la régulation des équilibres ioniques à proximité des neurones ainsi qu'au contrôle des réponses neuronales aux influx nerveux en interceptant des neurotransmetteurs (5, 6)
- Enfin, les astrocytes participent à l'isolation des neurones en bordant aussi leur membrane plasmique ainsi qu'à l'isolation du SNC en général, en isolant les vaisseaux sanguins, séparant ainsi le compartiment vasculaire du parenchyme nerveux : la glie limitante périvasculaire. Cette structure participe à la mise en place de la barrière hémato-encéphalique qui préserve le SNC de composés sanguins délétères à son fonctionnement. Cette barrière est composée des cellules endothéliales, de la membrane basale des capillaires ainsi que des pieds vasculaires des astrocytes. Néanmoins la protection du SNC semble moins résider dans la composition cellulaire de la barrière que dans les adaptations particulières qui les caractérisent : peu de vésicules de transcytose traversant les cellules endothéliales et la présence de jonctions occlusives entre ces dernières (3)

On rencontre également les oligodendrocytes qui sont les cellules gliales les plus nombreuses (3). Ces cellules développent des prolongements qui s'enroulent autour des axones et dendrites des neurones pour former la gaine de myéline (3). Cette gaine lipidique forme une couche isolante facilitant la conduction nerveuse du potentiel d'action le long des prolongements neuronaux. A noter que contrairement aux cellules de Schwann du SNP, un oligodendrocyte forme une gaine de myéline pour plusieurs neurones (3). (image 2)



www.easynotecards.com

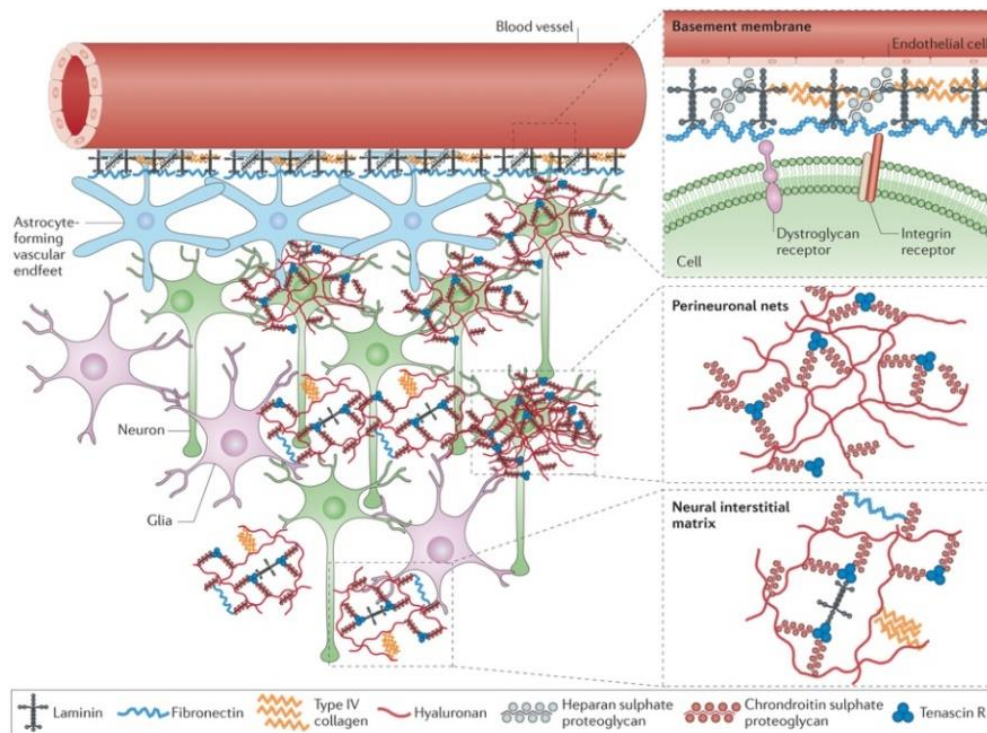
**Image 2 : Représentation schématique de l'organisation et des agencements entre cellules nerveuses et gliales.**

Enfin, les cellules microgliales ou microgliocytes, sont originaires du mésoderme et colonisent le SNC en période fœtale ou néonatale (3). Elles font partie du système immunitaire de la moelle épinière et participent à la surveillance immunitaire locale (3). Elles se trouvent partout dans le tissu mais semblent privilégier les zones proches des vaisseaux et des péricaryons (3). Elles présentent de nombreux prolongements longs et ramifiés disposés

autour d'un petit noyau, à la manière de cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, leur capacité de phagocytose semble par contre limitée (3). Après une lésion du tissu, les microgliocytes sont à l'origine de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui stimulent la production de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (1). Ces molécules facilitent l'entrée de cellules inflammatoires à travers la barrière hémato-encéphalique (1).

## 1.2) La matrice extracellulaire du SNC

La matrice extracellulaire (MEC) occupe une place prépondérante du SNC et contribue à sa physiologie normale (7). Effectivement, environ 20% du volume total du SNC adulte est formé par le compartiment extracellulaire. Ce dernier contient une matrice très organisée (8), qui sert d'échafaudage physique pour la construction du tissu, mais aussi de plateforme dynamique de signalisation qui régule les connexions entre les cellules du SNC (9).



**Image 3 : Représentation schématique de l'organisation de la matrice extracellulaire du SNC.**

Lau L.W. *et al.*,  
2013

Cette MEC est formée principalement de glycosaminoglycans (GAG's) (polymères linéaires d'unités disaccharidiques formées d'un hexosamine et d'un ose) dont l'acide hyaluronique (HA), de protéoglycans, formés par l'association de GAG's et d'un squelette central protéique (chondroïtine sulfate protéoglycan (CSPG), dermatan SPG, heparan SPG, keratan SPG) et de protéines tenascines (8, 10, 11). Cette MEC est distribuée dans trois compartiments principaux. Premièrement, au niveau de la membrane basale, entrant dans la composition de la barrière hémato-encéphalique, en formant un feuillet qui sert de frontière entre les cellules endothéliales et le parenchyme du SNC (10). Cette dernière est faite principalement de collagène, d'entactine-nidogène, de fibronectine, de dystroglycan et de perlecan (10). (image 3)

La deuxième structure de cette MEC est le filet périneural (« perineuronal net » en anglais), une couche matricielle condensée, formée de fibres enchevêtrées et composée de protéoglycans, tenascine R et de protéines de liaisons ainsi que d'HA (10). Cette structure entoure les corps cellulaires des neurones ainsi que les dendrites proximaux (10). Enfin, la matrice interstitielle est un réseau dense de protéoglycans, d'HA, de tenascines et de protéines de liaison ainsi que de petites quantités de protéines fibreuses (collagène et élastine) et de glycoprotéines d'adhésion (laminines et fibronectine) (10). (image 3)

Les protéines ténascines : il s'agit de protéines de la MEC, il en existe plusieurs types tels que la ténascine C, impliquée dans la guidance des neurones en migration et axones durant le développement, le remodelage synaptique ainsi que dans la régénération neuronale. Elle agit via des liaisons avec certaines intégrines (45). On retrouve également la ténascine R, protéine de la MEC nerveuse impliquée dans des interactions avec différentes cellules et composés de la MEC. Ces interactions peuvent influencer le comportement cellulaire en provoquant des différenciations, des adhésions stables, des répulsions et inhibitions de croissance de neurites (46).

L'entactine nidogène : glycoprotéine se trouvant préférentiellement dans la MEC formant les lames basales et liant les laminines. Elle intervient dans l'organisation de la matrice et dans des processus d'adhésions (3, 47).

Fibronectine : glycoprotéine permettant l'ancrage de cellules dans/sur la matrice MEC par l'intermédiaire d'intégrines (3).

Dystroglycan : le complexe des dystroglycans est impliqué dans différents procédés dont l'assemblage de la laminine et de la membrane basale, la survie cellulaire, la migration cellulaire, la polarisation épithéliale, etc... L'alpha-dystroglycan est une glycoprotéine périphérique extracellulaire qui agit comme récepteur pour des protéines de matrice possédant des domaines laminine-G. Le bêta-dystroglycan est quant à lui une protéine transmembranaire qui joue un grand rôle dans la connexion entre la MEC et le cytosquelette (48).

Perlecan : aussi appelé héparan sulfate protéoglycan 2, il s'agit d'un composé intrinsèque de toutes les membranes basales et MEC (12). Il est impliqué dans un large éventail de fonctions dans le développement normal ou après des processus pathologiques : liaison à d'autres protéines extracellulaires, liaison à divers facteurs de croissance ainsi qu'à des récepteurs cellulaires (13). De par sa position stratégique et sa structure unique, le perlecan a été impliqué dans la modulation d'activités de divers facteurs de croissance que ce soit dans un contexte de développement normal ou dans l'homéostasie tissulaire (12)

CSPG's : les chondroïtine sulfate protéoglycans font partie de la famille des protéoglycans, des macromolécules composées d'une protéine centrale sur laquelle sont liés de façon covalente des GAG's (14). Ceux-ci contiennent des associations plus complexes et variées de disaccharides que l'HA et forment des structures plus courtes comprenant des sucres sulfatés (3). Les CSPG's entrent dans la composition de la MEC et sont largement exprimés dans le SNC en développement et adulte (14). Ce groupe comprend le neurocan, brevican, phosphocan et versican (14). Des études *in-vitro* ont démontré leur potentiel à restreindre la croissance des neurites et on pense qu'ils inhiberaient la régénération axonale après lésion du SNC (14). Il fut démontré que les CSPG's sont up-régulés après une lésion de moelle épinière (14). Certains composés, tel que le neurocan, vont être sécrétés par les astrocytes après une lésion tissulaire, on peut alors constater une augmentation de la production de ces composés dans la région lésée, plus de deux mois après l'induction de la lésion (bien que certains CSPG's commencent par diminuer juste après la venue des dégâts tissulaires) (14).

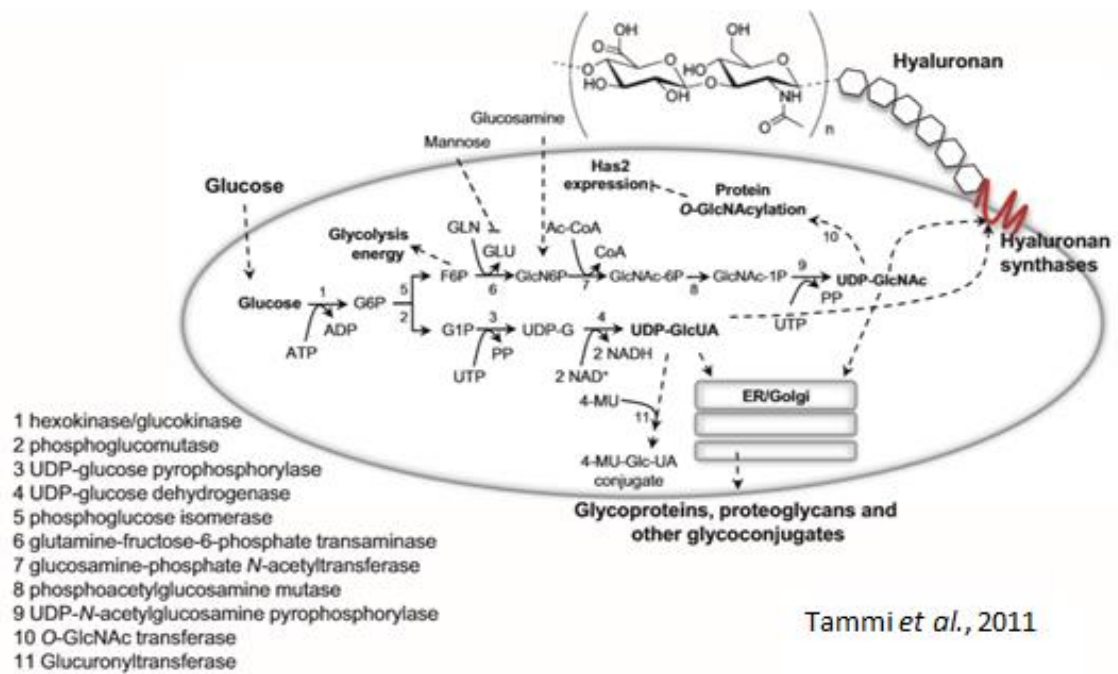


Image 5 : Schéma représentant la voie de synthèse de l'HA ainsi que celles de ses précurseurs.

### 1.3) L'acide hyaluronique

#### 1.3.1) Description

L'HA est un polysaccharide présent dans tous les tissus et fluides corporels du corps des vertébrés, typiquement dans le tissu interstitiel (15). Il s'agit d'un GAG, formé de dimères d'acide N-acétylglucosamine et d'acide D-glucuronique (3) où tous les liens sont de type  $\beta$  : 1-3 pour le lien entre l'acide D-glucuronique et l'acide N-acétyl glucosamine, et 1-4 entre les dimères saccharidiques (16) (image 4). Les fragments synthétisés peuvent atteindre des tailles imposantes de l'ordre de plusieurs millions de Daltons (16). De hautes concentrations d'HA sont trouvées dans les capsules articulaires, l'humeur vitrée de l'œil, la gelée de Wharton du cordon ombilical, dans le liquide amniotique, les tissus fœtaux et dans tous les tissus subissant une prolifération ou réparation rapide (17). Environ 50% de l'HA se situe dans la peau et 25% dans le squelette et les articulations, le reste étant réparti entre les muscles et les viscères (15). Il peut exister sous diverses formes selon le poids moléculaire (faible ou haut) avec différentes fonctions biologiques associées (9).

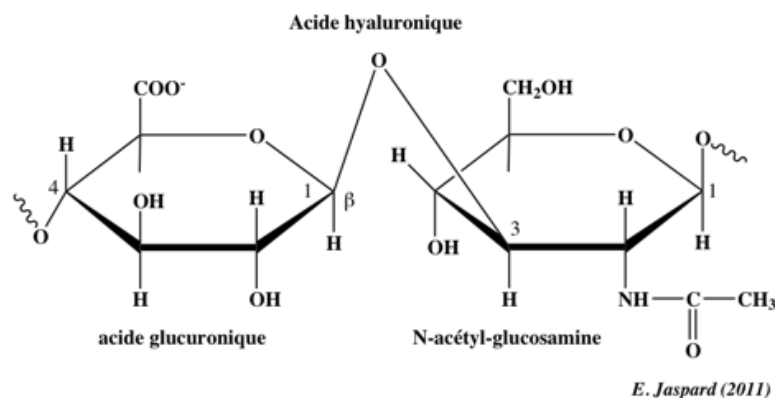


Image 4 : Structure moléculaire d'un monomère disaccharidique de l'HA.

#### 1.3.2) Métabolisme

L'HA est synthétisé au niveau de la membrane plasmique par trois enzymes appelées HA synthases (HAS 1,2 et 3) (18). Cette synthèse se fait par l'ajout d'unités disaccharidiques sur la chaîne principale à partir d'un précurseur nucléotidique tout en transloquant cette chaîne en croissance dans l'espace extracellulaire (18) (image 5). Les HAS sont transportées par la voie de sécrétion normale du système endo-membranaire, depuis le RE et le Golgi vers la membrane (18). Ces enzymes restent inactives jusqu'à leur insertion (18). Un pool inactif d'enzymes intracellulaire existe également dans le RE, dans des vésicules intracellulaires et dans l'appareil de Golgi, peut-être dans le but de former une réserve qui pourrait être rapidement mobilisée à la membrane en cas de stimulation (18).

Ces trois enzymes diffèrent par leurs propriétés enzymatiques et leur régulation par les stimuli externes, mais des fonctions clairement distinctes n'ont pas pu être établies (18) bien que HAS3 ait été montrée comme synthétisant des chaînes plus courtes d'HA, du moins, dans des études de fragments membranaires *in vitro* (18).

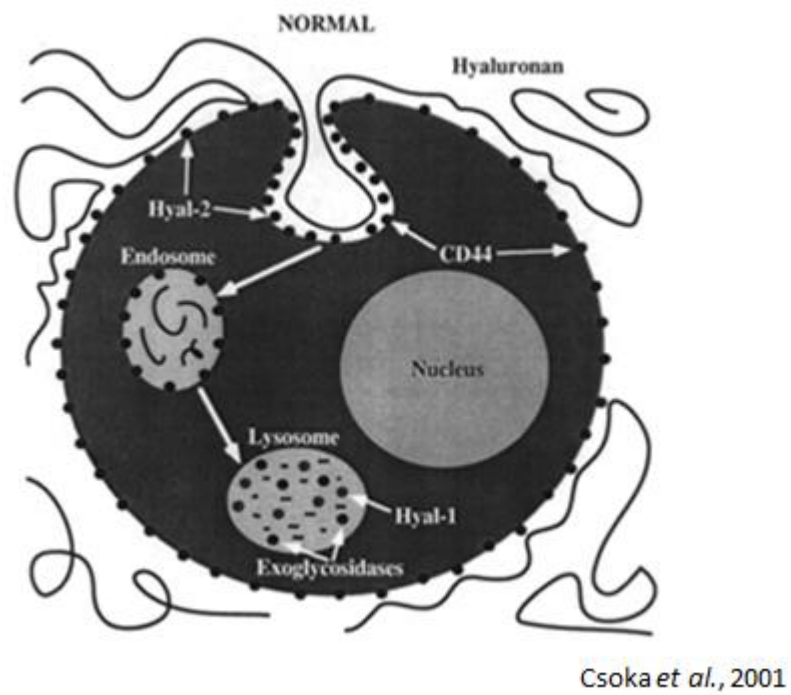


Image 6 : Schéma représentant la voie de liaison, internalisation et de dégradation de l'HA.



Leur distribution au niveau subcellulaire montre des similitudes mais également des différences, reflétant probablement des fonctions biologiques différentes et suggérant différents mécanismes régulatoires de leur trafic et de leur activation (18). Les enzymes sont connues pour être différentiellement exprimées, HAS2 étant de manière générale majoritaire (18). Ajoutons que seule l'invalidation du gène HAS2 est létale *in utero* chez la souris (18).

Il existe un turnover de l'HA au sein des tissus, et celui-ci peut être rapide (16). Un individu de 70kg possède environ 15g d'HA et un tiers de cette masse est remplacé chaque jour (16). Cependant, son turnover varie selon le type tissulaire (16). Ainsi, dans la circulation sanguine, son temps de demi-vie est très rapide, de 2 à 5 minutes ; au niveau de la peau, il sera de 1 à 2 jours mais dans un tissu plus « inerte » tel que le cartilage, ce temps de demi-vie atteindra de 1 à 3 semaines (16).

L'HA peut ainsi être dégradé de manière enzymatique par trois groupes d'enzymes : les hyaluronidases (HYAL), les  $\beta$ -Dglucuronidases et les  $\beta$ -N-acétyl-glucosaminidases (9). Ces activités maintiennent le niveau d'HA en balance avec sa synthèse (9). Concernant les HYAL, l'homme ainsi que la souris possèdent six séquences géniques hyaluronidases-likes (16). Trois sont présentes sur le chromosome 3 (3p21.3) les HYAL 1, 2 et 3 et trois autres gènes HYAL4, PHYAL1 (pseudogène, transcrit mais pas traduit) et SPAM (sperm adhesion molecule 1, qui code pour la protéine PH-20) sont rassemblés sur le chromosome 7 (7q31.3) (16). HYAL 1 et 2 constituent les hyaluronidases majeures des tissus somatiques, HYAL2 pourrait être la plus importante (15). Cependant, la façon dont ces enzymes sont régulées après une lésion de moelle épinière n'est pas claire (18, 19, 20). C'est donc ces deux enzymes qui semblent dignes d'intérêt dans la présente étude. En effet, HYAL 3 semble dépourvue d'activité hyaluronidase détectable, PH-20 se trouve à la surface du spermatozoïde pour faciliter la fécondation de l'ovocyte (aussi présente dans l'épididyme, le tractus génital féminin, les glandes mammaires ainsi que le placenta et les tissus fœtaux) et HYAL 4 est une chondroïtinase (16, 21).

Au niveau du schéma de dégradation de l'HA, il a été proposé que les fragments de haut poids moléculaire étaient rivés à la surface cellulaire par l'action combinée des récepteurs à l'HA tels que CD44 et RHAMM et de l'enzyme HYAL 2 (16). Ces fragments imposants vont être clivés pour donner environ 50 fragments intermédiaires de 20 kDa, le produit limite de la digestion de HYAL2 (16). Ces premiers produits sont alors délivrés dans des compartiments endosomaux et finalement au sein de structures lysosomes-likes (16). Un catabolisme supplémentaire a alors lieu via l'enzyme HYAL1, coordonné avec l'activité de deux autres types d'enzymes, lysosomales, cités précédemment : la  $\beta$ -Dglucuronidase et la  $\beta$ -N-acétyl glucosaminidase qui découpent les monosaccharides séquentiellement sur la terminaison non-réduite des oligomères d'HA (16, 17). (image 6)

Il est important de noter que tout l'HA internalisé n'est pas immédiatement dégradé. En effet, des chaînes intactes ont été détectées dans le cytoplasme, le noyau et même le nucléole (16).

HYAL2 apparaît donc comme une enzyme membranaire, celle-ci est ancrée à la membrane plasmique par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) mais une partie des HYAL2 se retrouve sous forme soluble (16). Comme exposé ci-dessus, HYAL 1 au contraire apparaît comme une enzyme lysosomale qui va cliver des petits fragments : les tétrasaccharides seront ses produits majeurs (16). Cette enzyme est aussi la hyaluronidase circulante du plasma (16).



Les hyaluronidases apparaissent sous des formes variées, toutes des produits de modifications post-traductionnelles (16). Les hyaluronidases matures subissent ainsi deux types de modifications additionnelles différentes, soit deux clivages endoprotéolytiques ou une seule étape protéolytique qui libère l'enzyme de son ancre GPI et donc de la membrane (16). HYAL1 est un exemple de la première classe, elle existe en deux tailles, une forme de 54 kDa seule isoforme du plasma et une autre de 49 kDa (16) (une autre version est parfois donnée, avec des masses respectives de 57 et 45 kDa) (17). HYAL 2 quant à elle serait un exemple de la deuxième classe, bien que ceci n'ait pas été établi de manière univoque en conditions physiologiques (16).

Enfin fut également postulé qu'un mini organel associé à la membrane, le hyaluronasome, pourrait exister, dans lequel des réactions enzymatiques de synthèse et catabolisme de l'HA auraient lieu de manière coordonnée (16). Il est possible qu'il soit présent à la surface cytoplasmique des membranes cellulaires et contiennent des récepteurs à l'HA, comme RHAMM et CD44, les HAS 1, 2 et 3, des HYAL, des inhibiteurs de HYAL, des protéines de liaison de l'HA, et les  $\beta$ -exoglycosidases (16). Il formerait une unité fonctionnelle fournissant une réponse mécanistique à l'état métabolique de la cellule (16). Ainsi, un traitement de préparations membranaires isolées avec des concentrations de HYAL stimulaient une synthèse d'HA (16). Ceci suggère qu'un mécanisme de feedback existe qui permet aux cellules de sentir les niveaux d'HA qui ont été synthétisés (16). Ces taux d'enzymes peuvent également modifier la quantité de récepteurs CD44 en surface (16). L'hypothèse est alors que ce hyaluronasome répondrait dynamiquement aux événements intra- et extracellulaires et serait capable de réguler les niveaux de déposition d'HA avec précision par une régulation allostérique des enzymes de synthèse et de dégradation (16). Il pourrait donc répondre aux états physiologiques de la cellule par une série de récepteurs à l'HA, membranaires ou solubles, des protéines de liaisons et des co-facteurs qui déclenchent des événements enzymatiques et des voies de transduction du signal (16).

Dans certaines circonstances, on peut observer un enrichissement de la MEC en HA, par exemple durant le développement embryonnaire, dans le cas d'une réparation après blessure, d'infarctus du myocarde, dans l'état septique, le gonflement subséquent à la transplantation d'organe, en cas de thrombose, d'une réaction immunitaire, d'une inflammation ou encore dans des cas de carcinogenèses. Cette réaction s'accompagne alors également de la multiplication des récepteurs de la molécule (15, 17).

### **1.3.3) Rôles**

L'HA peut aussi bien agir comme un composé structural de la MEC qu'en tant que médiateur de fonctions cellulaires variées (15). Certaines de ses fonctions dépendent de ses propriétés intrinsèques telles que son rôle dans l'homéostasie de l'eau et par conséquent dans la visco-élasticité des tissus, les interactions avec les membranes cellulaires et autres structures lipidiques ainsi que l'exclusion stérique d'autres macromolécules (15). L'un des rôles clés de l'HA reste sa capacité à créer une rétention d'eau dans son état hydraté, permettant de contrôler l'hydratation des tissus et leur visco-élasticité (15). Ainsi, par ses nombreuses associations possibles tel que le lien à l'aggrécan, l'HA peut former des agrégats macromoléculaires imposants, présents dans le tissu et qui vont attirer l'eau par effet osmotique (15). D'autres exemples de telles associations existent dans le SNC comme les

liens aux versican, neurocan et brevican (CSPG) (15). De plus, les GAG's se forment en gels capables d'attirer dans leur voisinage des cations comme le Na<sup>+</sup>, phénomène à l'origine d'une turgescence du tissu conjonctif lui permettant de résister aux forces de compression (3). De manière générale, les GAG's remplissent les espaces extracellulaires offrant un support mécanique aux tissus. Ils permettent aussi une diffusion efficace de nutriments et autres composés hydrosolubles et la migration cellulaire (3).

De par ses groupements carboxyles, l'HA montre un état fortement ionisé au pH extracellulaire (15). De nombreux ponts hydrogènes peuvent alors se former le long de la chaîne de la macromolécule, permettant alors d'adopter une forme tournante et la création de zones internes hydrophobes. Cette structure rend possible des associations avec d'autres chaînes d'HA et avec les membranes cellulaires ou toute autre structure lipidique (15). De plus, la structure polymérique de l'HA peut être stabilisée par des interactions inter-chaînes (15). Celles-ci, en collaboration ou non avec des liens aux fibres de collagène et autres macromolécules vont réduire sa mobilité et vont influencer sa perméabilité aux macromolécules et lui donnent de cette manière un rôle dans l'exclusion stérique de divers composés (15).

D'autre part, l'HA est impliqué dans de nombreuses interactions avec d'autres molécules de la MEC ou de la surface cellulaire de part de nombreux sites de liaison spécifiques tels que des récepteurs de surface comme CD44 ou RHAMM (15). Dans certains cas, l'association du récepteur et de sa cible va provoquer une réaction active de la cellule comme une endocytose et une activation de son catabolisme, ou encore une stimulation de la motilité ou de la prolifération cellulaire (15). Dans d'autres cas, ce lien permet d'ancrer l'HA sur les cellules, l'intégrant ainsi au glycocalyx pour médier des interactions intercellulaires ou pour entrer simplement dans la composition de la MEC. Par exemple, on remarque une intervention de l'HA dans la stabilisation de la matrice du cartilage (15). Ces rôles vont évidemment varier avec le type cellulaire impliqué (15).

Le récepteur CD44 est donc un récepteur à l'HA mais pas seulement, il peut également lier l'ostéopontine, le collagène et les matrix metalloproteinases (49). Ce récepteur participe à la médiation d'interactions intercellulaires ou entre cellule et matrice (49). L'interaction avec l'HA joue un rôle important dans la migration cellulaire, la croissance et la progression tumorale (49). Le récepteur RHAMM est quant à lui impliqué dans la motilité cellulaire (50).

Enfin, rappelons que l'HA peut exister sous différents poids moléculaires qui détiennent des rôles distincts (9). C'est ainsi que l'HA de haut poids moléculaire (HMW-HA) est connu pour sa responsabilité dans la réparation du tissu fœtal sans cicatrice ou encore dans l'angiogenèse (fragments atteignant les 107 kDa), les tailles intermédiaires pour leur rôle dans l'angiogenèse, l'inflammation et la stimulation de l'immunité (22). Les fragments de faible poids moléculaire (LMW-HA) sont connus pour leurs propriétés pro-inflammatoires et leur influence dans la prolifération cellulaire (9). Les tétrasaccharides issus de leur dégradation détiennent des rôles anti-apoptotiques et agissent comme des puissants inducteurs des Heat Shock Proteins (16).

#### **1.3.4) L'HA dans le SNC**

La localisation et les activités de l'HA suggèrent qu'il influence la progression de la réaction de gliose (23). Dans le SNC normal, l'HA est synthétisé de manière prédominante par les astrocytes et est localisé autour des fibres myélinisées dans l'espace interstitiel entre ces dernières et les prolongements des astrocytes, tandis qu'il entoure les corps cellulaires de neurones dans la matière grise, participant à la formation du filet périneural (23). Son rôle dans le SNC n'a pas encore été étudié profondément (23) et il semble qu'il existe des contradictions à ce sujet. Ces dernières années, le métabolisme de l'HA est devenu un domaine d'investigations intéressant dans le SNC, différentes études suggérant qu'il y aurait des rôles bénéfiques potentiels de cette molécule sur la repousse axonale après lésion, bien que, comme déjà précisé, ceci reste controversé.

### **1.4) Les traumatismes médullaires**

#### **1.4.1) Contexte épidémiologique**

Approximativement 2,5 millions de personnes sont touchées par une lésion de la moelle épinière dans le monde avec plus de 130 000 nouveaux cas enregistrés chaque année (International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis) (24). Malheureusement, ces patients ne peuvent espérer qu'une récupération limitée car il n'existe actuellement aucune stratégie thérapeutique pour améliorer la réparation des tissus nerveux lésés (25), bien que certaines techniques comme l'utilisation de olfactory ensheathing cells pour guider la repousse axonale aient donné des résultats encourageants chez les rongeurs et les humains (26, 27).

#### **1.4.2) Evolution de la MEC et cicatrisation après une lésion médullaire**

Suite à la lésion du tissu médullaire, divers dommages se produisent de manière séquentielle. La première étape, appelée phase aigüe, apparaît directement après le trauma et est caractérisée par une mort cellulaire ainsi qu'une axotomie des fibres nerveuses traversant la région touchée (19). Peu de temps après la lésion, on constate une élévation de la concentration en composés oxydatifs (ROS) qui vont participer à la mort cellulaire par une oxydation des composés lipidiques membranaires ainsi qu'une fragmentation des protéines et de l'ADN (28, 29). Ensuite, une seconde étape survient de plusieurs heures à plusieurs semaines après la lésion, celle-ci est caractérisée par le développement d'une inflammation locale, des dégâts vasculaires, une déplétion en composés énergétiques, une démyélinisation ainsi qu'une altération de la composition du fluide extracellulaire (1, 19). Ces phénomènes mènent à une mort cellulaire accentuée et par conséquent, à des déficits fonctionnels supplémentaires (19). Durant cette seconde phase, la région lésée va être infiltrée par des cellules inflammatoires (19). Les cellules gliales intrinsèques, aussi bien macroglie que microglie, de la moelle épinière vont s'activer (19). Parmi celles-ci, les astrocytes locaux qui vont subir divers modifications telles qu'une hypertrophie, une hyperplasie et une motilité augmentée dans et autour de la zone lésée, processus plus connu sous le nom de gliose ou plus précisément pour ces cellules, d'astrogliose (3).

Durant la phase chronique, c'est-à-dire de plusieurs jours à plusieurs mois après le traumatisme, une nouvelle MEC va être synthétisée par les cellules gliales dans la région lésée (probablement par les astrocytes et la microglie pour la majorité) et ce, afin de remplir les trous laissés par la lésion et ainsi permettre de cicatriser le tissu nerveux (11).

Au final, ces changements mènent à la formation d'un plexus dense de cellules et de MEC qui forment ensemble la cicatrice gliale (23). Sa fonction n'est pas entièrement connue mais il semble qu'elle soit destinée avant tout à isoler la zone endommagée du tissu intacte qui l'entoure (23).

Néanmoins, la conséquence de la présence de cette cicatrice gliale est l'inhibition de la régénération axonale par des interactions chimiques mais aussi par la formation d'une barrière physique difficilement pénétrable par les cônes axonaux émergeant des fibres nerveuses axotomisées qui tenteraient de repousser (23).

Il a été démontré que certains composés de cette matrice influençaient la repousse axonale après une lésion médullaire. Par exemple, il a été prouvé que le CSPG agissait comme un inhibiteur de cette repousse (11, 22), tandis que le HSPG semblait lui promouvoir la régénération axonale (11). Il est également connu que divers composés de la gaine de myéline, connus sous le nom de myelin-associated inhibitors (MIAs) agissent comme inhibiteurs de cette repousse axonale, par exemple la protéine transmembranaire du RER NogoA ou encore la glycoprotéine MAG (myelin-associated glycoprotein) (26, 30, 51). Limiter l'activation des cellules gliales et moduler la composition de la cicatrice gliale pourraient donc former une stratégie intéressante pour améliorer la réparation du SNC (9).

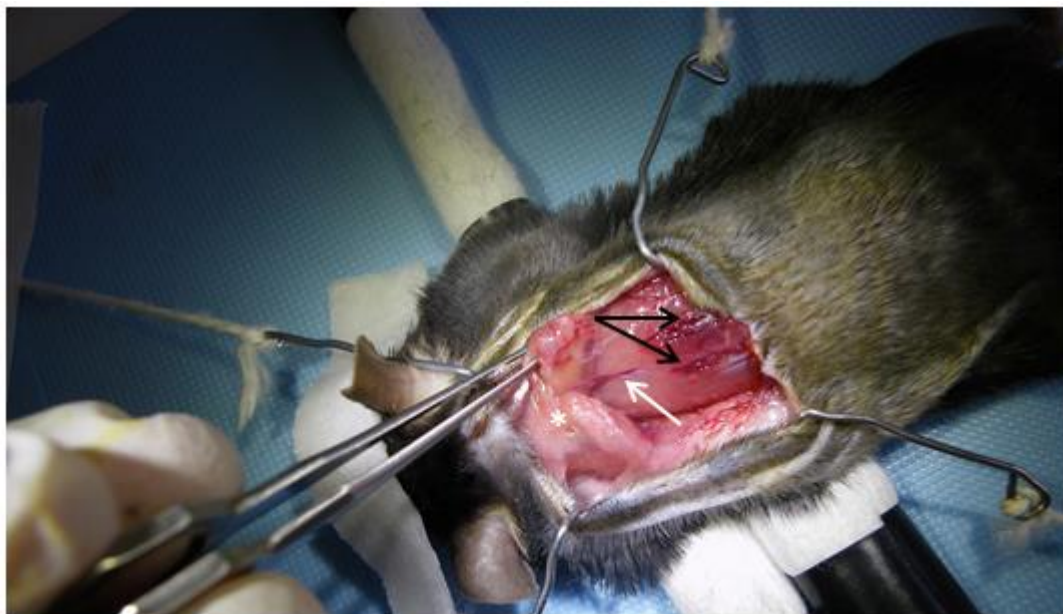
### **1.5) But du travail**

A travers nos expérimentations, notre objectif consiste à caractériser le contenu de la moelle épinière lésée et normale en HA chez la souris et ainsi étudier sa distribution spatio-temporelle, la régulation des enzymes intervenant dans son métabolisme et les cellules potentiellement responsables de ce métabolisme. Peu d'études ont évalué la distribution de l'HA et des enzymes qui sont liées à son métabolisme après une lésion de la moelle épinière, bien que certaines études démontrent de potentiels rôles bénéfiques de l'HA dans ce contexte pathologique. Investiguer ce sujet pourrait donc ouvrir de nouvelles voies dans la recherche de traitements contre ces dégâts tissulaires.



**Image 7 : Vue sur les tissus dorsaux de la souris lors de l'opération.**

Une fenêtre a été mise en place sur les tissus à l'aide d'écarteurs. On peut apercevoir les deux tendons principaux des muscles dorsaux en blanc (flèches noires) qui vont servir de repères pour les incisions pratiquées dans les muscles de part et d'autre de la colonne vertébrale. La glande thyroïdienne est marquée d'un astérisque blanc.



**Image 8 : Vue sur les tissus dorsaux de la souris lors de l'opération.**

La glande thyroïdienne (astérisque blanc) a été dissociée du tissu musculaire et conjonctif et a été rabattue dans la région cervicale permettant ainsi de localiser la veine importante qui la traverse (flèche blanche). Cette localisation permet d'éviter de la rompre, ce qui coûterait la vie à l'animal, mais il s'agit en plus de notre repère anatomique permettant de localiser la vertèbre T9. Les incisions devant se faire dans le prolongement des tendons des muscles dorsaux ont déjà été réalisées ici (flèches noires).

## **2. Matériel et méthodes**

Le protocole d'étude suivant fut mené selon les directives européennes pour l'expérimentation animale (directive 2010/63/UE) et fut approuvé par le Comité d'éthique animale de l'Université de Namur (projet éthique 15-239).

### **2.1) Le modèle murin de traumatisme médullaire compressif**

Dans le passé, le rat fut le modèle favorisé pour l'étude des lésions de la moelle épinière et sa physiopathologie, néanmoins, le développement d'animaux génétiquement modifiés chez l'espèce murine est un argument poussant vers l'adoption de ce modèle dans les lésions médullaires (31). L'intérêt de ce modèle est également la ressemblance entre les traumatismes chez les souris et ceux chez l'homme d'un point de vue histo-pathologique (32). Ainsi, après un traumatisme médullaire, on peut observer chez ces animaux, une perte similaire de l'architecture de la moelle, une même perturbation des substances grise et blanche ainsi qu'une mort neuronale semblable. Tous ces dommages sont liés à des déficits fonctionnels observables tels que des déficits moteurs et sensitifs (32).

Les animaux utilisés étaient des souris C57Bl6/J mâles de Janvier Labs (Le Genest St Ilse, France) ou provenant de notre élevage interne, âgées de 9 à 16 semaines. Pour commencer, 8 souris ont été utilisées pour mettre au point le temps de compression qui allait être choisi pour nos expérimentations. Ces souris ont été conservées durant 2 semaines après chirurgie et ensuite sacrifiées. Ensuite, après avoir sélectionné le temps de compression médullaire d'une durée de 30 secondes, 30 autres souris ont été opérées : 15 subirent une compression médullaire et 15 autres, seulement une laminectomie (animaux contrôles, voir la description de la chirurgie). Ces souris ont été conservées 2 semaines après chirurgie. Enfin, 30 autres souris ont été opérées (15 compressions et 15 laminectomies) et suivies pendant 6 semaines. Toutes les souris ont été conservées jusqu'au terme du temps prévu du protocole excepté les individus morts dans les heures ou jours qui suivirent les opérations ainsi que les animaux euthanasiés prématurément pour cause d'infection, de blessure grave ou de dégradation importante de l'état de santé global.

La première étape de nos travaux consistait en la génération de notre modèle de trauma médullaire et plus précisément de compression médullaire, ciblant la région vertébrale T9. L'animal était endormi à l'aide d'un mélange de sérum physiologique (solution NaCl 0,9%), kétamine 100mg/kg (Ketamine 1000 Ceva®, Bruxelles, Belgique) et xylazine 5mg/kg (XYL-M® 2% VMD, Arendonk, Belgique). Son dos était rasé et après vérification de la profondeur d'anesthésie (absence de réaction suite au pincement des pattes et/ou de la queue), la chirurgie pouvait être lancée.

L'opération chirurgicale était réalisée sous microscope binoculaire (Olympus SZX9 and Highlight 2100, Tokyo, Japon). Dans un premier temps, une incision de la peau dorsale était pratiquée à l'aide d'un scalpel et d'une paire de ciseaux, en commençant au niveau du paroxysme de la courbure du dos et en remontant jusqu'à la région cervicale. La peau était ensuite séparée des tissus sous-jacents et une fenêtre de chirurgie était réalisée au moyen d'écarteurs (image 7). L'étape suivante consistait en l'incision longitudinale des muscles dorsaux, dans le prolongement des deux grands ligaments du dos, en faisant une incision de chaque côté de la colonne vertébrale (image 8). Durant ces incisions, il était important de bien localiser la veine principale qui traverse la glande hibernante (glande graisseuse située au niveau cervical bas) et plonge ensuite entre les vertèbres (le plus souvent entre les vertèbres T5 et 6) pour rejoindre la région thoracique (image 8).

Ceci était nécessaire car d'une part, il s'agit d'un repère anatomique de toute première importance qui nous permettait de localiser notre région vertébrale d'intérêt. D'autre part, il fallait éviter à tout prix de blesser ce vaisseau sanguin, ce qui aurait mené à une hémorragie massive et à la mort de l'animal.

Les portions de muscles situées entre les deux incisions étaient alors extraites avec une pince-rongeur permettant d'atteindre la colonne vertébrale. La vertèbre T9 était ensuite repérée grâce à une pièce graduée de 5,6 mm (distance la plus courante entre le vaisseau de la glande hibernante et la vertèbre d'intérêt) dont l'extrémité était placée au niveau de la veine principale de la glande hibernante et l'autre extrémité de l'étalon ciblait la vertèbre T9.

L'étape suivante consistait en la laminectomie de la vertèbre T9 à l'aide d'une pince-rongeur, c'est-à-dire enlever la lame dorsale de la vertèbre, mettant alors la dure-mère et la moelle épinière à nu. La lésion était ensuite induite, en passant une petite pince de part et d'autre de la moelle et en procédant à la compression de cette dernière. Cela a tout d'abord été réalisé durant différents temps (5, 15, 30 ou 60 secondes) dans la mise au point du modèle. Ensuite, après analyse, c'est la compression de 30 secondes qui fut conservée pour les études ultérieures.

Finalement, les muscles dorsaux étaient recousus et la peau refermée à l'aide d'agrafes de suture (MikRon® Precision 9mm, Inc. Gardena, Californie, USA). Les animaux étaient placés dans une cage propre et chauffée, ils recevaient une injection de 1 ml de liquide de Ringer (AKE2324, Baxter, Lessines, Belgique) pour la réhydratation, 0.1ml d'antibiotique Céfazoline 1mg/kg (Cefazolin sodium SANDOZ®, Bâle, Suisse) ou enrofloxacin 5%, dose 5mg/kg (Baytril® Bayer, Leverkusen, Allemagne)), poursuivie durant 5 jours post-opératoires et une injection d'analgésique buprénorphine 0,05mg/kg (Vetergesic® 0,3 mg/ml Ecuphar, Oostkamp, Belgique) répétée après 12 et 24 heures post-opératoires.

Les souris contrôles étaient soumises à la même opération excepté l'étape de compression médullaire. Les animaux ont été conservés durant 2 semaines après l'opération pour le groupe test (test du temps de compression) et le premier groupe étudié et pendant 6 semaines pour le second groupe.

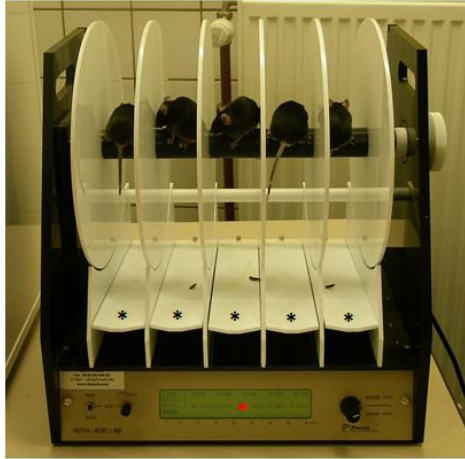
## **2.2) Evaluations des performances motrices**

Les souris du second groupe qui ont été conservées 6 semaines après l'opération ont été soumises à trois tests différents avant l'opération ainsi que durant les 6 semaines suivantes permettant d'évaluer l'évolution de leurs performances motrices.

### **2.2.1) Cylindre en rotation : le Rotarod**

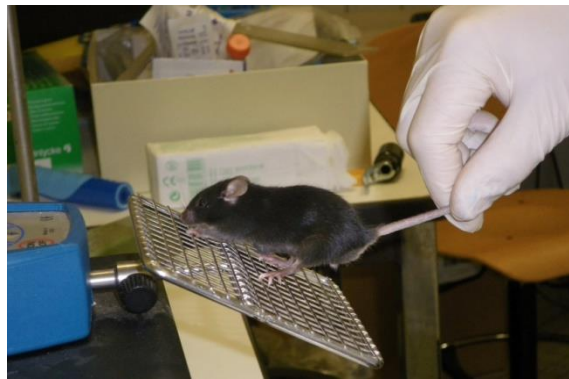
La machine utilisée était le Rota-Rod/RS (Panlab, Barcelone, Espagne). Il s'agit d'un appareil constitué d'un long et fin cylindre horizontal autour duquel se trouvent des disques qui délimitent 5 places distinctes. Ce cylindre est sujet à un mouvement de rotation qui s'accélère avec le temps en commençant à une vitesse de 4 tours par minute. Les animaux étaient placés sur l'appareil, la rotation, une fois mise en route, s'accélérait progressivement au cours du temps jusqu'à devenir intenable pour l'animal. Ce dernier tombait alors de la structure en rotation sur une petite plateforme de plastique qui s'affaissait sous le poids de l'animal et indiquait sur un écran le temps durant lequel la souris avait tenu sur la structure rotative.





**Image 9 : Le Rotarod.**

Les souris sont ici en plein test. On peut voir le barreau rotatif sur lequel les souris sont posées, les plateaux en plastiques qui s'affaisseront sous le poids de l'animal en chute et arrêteront le chronomètre mesurant le temps (astérisques noirs) et enfin l'écran affichant les temps et la vitesse de rotation (astérisque rouge).



**Image 10 : Grip strength, mesure de la force des 4 membres combinés.**



**Image 11 : Grip strength, mesure de la force des membres antérieurs.**



Les animaux ont subi 2 semaines d'entraînement avant l'opération (5 séances la première semaine, 2 la seconde), une mesure de base juste avant l'opération ainsi qu'une séance par semaine après l'opération (excepté la semaine de la chirurgie) durant 6 semaines à raison de 3 mesures par séance. (image 9)

### **2.2.2) Force de préhension : le Grip strength**

L'appareil utilisé était le Grip strength test meter Model GS3 (Bioseb, Chaville, France). Ce test permet de mesurer la force développée par les membres de l'animal. Il se réalise à l'aide d'un appareil de mesure prolongé par une grille sur laquelle l'animale effectuait une traction et la force exercée était alors mesurée. Pour cela, l'animal était maintenu par la queue et posé sur la grille de telle sorte qu'il s'y agrippe. Pour mesurer la force des membres postérieurs (ceux qui nous intéressent étant donné que ce sont eux qui sont temporairement paralysés après la chirurgie), le test était réalisé d'abord sur les 4 membres à la fois et ensuite sur les membres antérieurs uniquement. La soustraction des deux résultats permettait d'avoir accès à la force des membres postérieurs. Les animaux ont subi une séance par semaine (excepté la semaine de l'opération) durant 6 semaines à raison de 3 mesures par séance pour chaque groupe de membres (antérieurs et les 4 à la fois) ainsi qu'une mesure de base avant la chirurgie. La valeur retenue pour les membres postérieurs était celle obtenue après soustraction des moyennes des résultats des membres antérieurs et des 4 membres à la fois. (images 10 et 11)

### **2.2.3) Test de suspension : le Hanging wire**

Le Hanging wire se réalisait à l'aide d'un cylindre plastique dont le fond est grillagé. La souris était placée sur la grille dans le fond du cylindre, celui-ci était retourné à 180° tandis que la souris s'agrippait et se maintenait dans le vide. La structure était maintenue ainsi à 60 centimètres de hauteur. Ce test mesurait le temps durant lequel la souris était capable de se retenir au grillage, le temps maximum étant une minute. Les animaux ont subi une séance par semaine (excepté la semaine de l'opération) durant 6 semaines à raison de 3 mesures par séance ainsi qu'une mesure de base avant la chirurgie. (image 12)

### **2.2.4) La Basso-Mouse-Scale**

De plus, les animaux ont été analysés quotidiennement afin de leur attribuer un score selon la Basso-Mouse-Scale (BMS), une échelle permettant d'attribuer un score de 0 à 9 à des animaux atteints de lésion médullaire selon les performances physiques de leurs membres : mouvements de la cheville, position des pattes, type de marche, position de la queue, stabilité du corps... 0 signifiant une paralysie totale et 9 un retour complet du mouvement des pattes et de la posture correcte (33). (image 13)

## **2.3) Processing des tissus**

Les souris incluses dans cette étude ont été sacrifiées par perfusion cardiaque au bout de 2 semaines pour les souris qui ont permis les tests des temps de compression et les souris du premier groupe et au bout de 6 semaines pour les souris du second groupe.

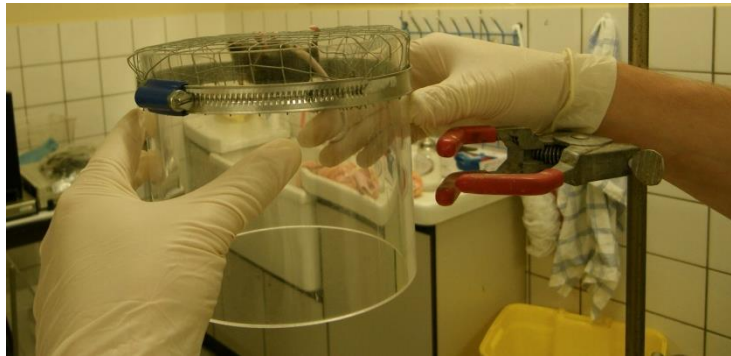


Image 12 : Hanging wire.

Score	Phénotypes
<b>0</b>	Aucun mouvement de la cheville.
<b>1</b>	Léger mouvement de la cheville : mouvement de rotation inférieur à la moitié du déplacement permis par l'articulation.
<b>2</b>	Mouvement étendu de la cheville : mouvement de rotation supérieur à la moitié du déplacement permis par l'articulation.
<b>3</b>	Placement plantaire de la patte ou marche occasionnelle voire fréquente à l'aide de la partie dorsale de la patte.
<b>4</b>	Marche plantaire occasionnelle (marche plantaire utilisée à une fréquence inférieure à la moitié du temps de déplacement).
<b>5</b>	Marche plantaire fréquente (marche plantaire utilisée à une fréquence supérieure à la moitié du temps de déplacement) sans coordination ou marche plantaire fréquente avec peu de coordination et la patte décrit un mouvement de rotation (ne reste pas dans l'axe du corps) dès le contact initial avec le sol, lors du déplacement.
<b>6</b>	Marche plantaire fréquente avec peu de coordination et la patte se retrouve parallèle au sol durant le contact avec le sol ou marche plantaire fréquente, coordonnée la plupart du temps et la patte est en rotation durant le contact initial ainsi que durant le mouvement.
<b>7</b>	Marche plantaire fréquente, coordonnée la plupart du temps et la patte est positionnée dans l'axe du corps lors du contact avec le sol mais en rotation lors du mouvement ou marche plantaire fréquente, coordonnée la plupart du temps et la patte est parallèle à l'axe du corps durant le contact avec le sol et le mouvement mais il demeure une sévère instabilité du tronc (déficits posturaux sévères de l'arrière-train tels que maigreur extrême, dandinement prononcé de l'arrière-train, effondrement des membres postérieurs, scoliose, spasmes, coup de hanche lors du déplacement).
<b>8</b>	Marche plantaire fréquente, coordonnée la plupart du temps, la patte est parallèle à l'axe du corps durant le contact avec le sol et pendant le mouvement et instabilité moyenne du tronc (moins de 3 événements cités ci-dessus) ou marche plantaire fréquente, coordonnée la plupart du temps, la patte est parallèle au corps durant le contact avec le sol et le mouvement, la stabilité du tronc est normale mais la queue reste baissée ou bien alterne des montées et des descentes.
<b>9</b>	Marche plantaire fréquente, coordonnée la plupart du temps, la patte est parallèle au corps durant le contact avec le sol et le mouvement, la stabilité du tronc est normale (pas de maigreur ou dandinement du tronc et la queue est maintenue vers le haut).

Image 13 : Tableau des scores attribués par la Basso-Mouse-Scale en fonction des performances physiques des animaux traumatisés (33).

La technique de base est restée la même pour tous les sacrifices avec néanmoins des petites différences selon les analyses auxquelles étaient destinés les échantillons prélevés.

Pour perfuser un animal, la souris était tout d'abord anesthésiée comme décrit précédemment. Une thoracotomie était réalisée, l'oreillette droite coupée et une seringue reliée à une pompe péristaltique (FH15, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) était introduite dans le ventricule gauche.

Dans le cas des animaux destinés à l'histologie, l'immuno-histochimie et l'immunofluorescence, du sérum physiologique glacé était tout d'abord injecté afin d'exsanguiner l'animal, avant d'injecter du paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), un fixateur chimique permettant de fixer les tissus et éviter ainsi leur autolyse.

Dans les cas des animaux destinés aux PCR's quantitatives et au dosage de l'HA, les animaux étaient seulement perfusés avec du sérum physiologique glacé et les divers prélèvements étaient plongés dans l'azote liquide.

Les moelles épinières destinées à l'histologie, l'immuno-histochimie et l'immunofluorescence devaient être fixées, coupées et étalées sur lames Superfrost + (Thermo scientific, Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne), afin de procéder aux études morphologiques et cellulaires. Les premières moelles, provenant de souris dont la moelle avait été comprimée durant des timings variables, et qui devaient permettre de choisir un temps de compression adéquat pour notre modèle ont été plongées dans un bain de PFA 4% overnight directement après prélèvement. Le tissu était ensuite rincé une heure dans de l'eau distillée avec d'être maintenu dans du sucrose 30% (VWR chemicals, Leuven, Belgique) durant 4 jours. Une portion de moelle de 6 mm était ensuite coupée (3mm de part et d'autre de l'épicentre) et était plongée dans de l'OCT (Tissue-Tek® SAKURA Finetek, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas) à l'intérieur d'une cupule plastique directement congelée sur une galette de carboglace. La cupule était ensuite conservée à -25°C. En ce qui concerne la découpe, ces premières moelles ont été coupées au cryostat (Leica CM 1900, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne) en coupe de 30 µm et étalées sur lames.

Par la suite, les tissus ont été conservés dans du PBS à 4°C après le passage overnight dans la PFA4%. Les tissus étaient ensuite déshydratés et inclus en paraffine à travers divers bains et enrobés en paraffine pour former un bloc que l'on dégrossissait au microtome (Leica RM 2145, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne). Pour réaliser la découpe, le bloc était trempé 2 heures dans le Molifex (VWR chemicals, Radnor, Pennsylvanie, USA), permettant ainsi de ramollir le tissu, mis sur glace environ 5 minutes pour avoir une paraffine rigide et coupé au microtome en coupes de 6 µm. L'ensemble du bloc était découpé et une coupe sur 5 fut conservée permettant une vue d'ensemble de la moelle sur environ 6mm avec une vue tous les 30 µm.

Chaque coupe était ensuite étalée sur une goutte d'eau sur lame Superfrost +, la lame était chauffée permettant de limiter les plis dans le tissu et l'eau était finalement évacuée et les lames séchées.

#### **2.4) Histologie : coloration Eriochrome C / Crésyl violet**

Pour les analyses morphologiques, nous avons employé une coloration Eriochrome C (Sigma, St Louis, Missouri, USA) qui colore des protéines associées à la myéline et Crésyl violet (Sigma, St Louis, Missouri, USA) qui met en évidence les noyaux et les blocs de Nissl.

Pour la coloration des coupes au cryostat, nos lames étaient tout d'abord séchées à température ambiante pendant plusieurs heures et chauffées durant 30 minutes à 48°C pour améliorer l'adhésion des coupes de tissu. Les lames étaient ensuite refroidies à température ambiante durant quelques minutes. Les échantillons étaient soumis à une réhydratation à travers différents bains (toluol, méthanol 100%, 95% et 70% et dans l'eau de ville). Après cette étape, ils étaient traités à l'Eriochrome C (chlorure de fer 10%, acide sulfurique 0,6% et 0,8g d'Eriochrome C) durant 1 minute et 45 secondes avant de passer dans l'eau de ville, d'être différenciés 5 minutes dans l'hydroxyde d'ammonium et trempés dans l'eau distillée quelques secondes. Pour la contre-coloration, nous avons utilisé du Crésyl violet 0,4% mis en contact avec les tissus durant 1 minute et différencié avec de l'éthanol. Finalement, les lames étaient déshydratées et montées au DPX (VWR, Radnor, Pennsylvanie, USA). Le protocole de coloration destiné aux coupes en paraffine était similaire si ce n'est que les temps de contact avec les deux colorants furent adaptés : 30 minutes dans l'Eriochrome C et 1 heure dans le Crésyl violet. A noter qu'en histologie, le temps de mise en contact avec un colorant sera inversement proportionnel à l'épaisseur de la coupe.

#### Quantification de la surface lésée, du volume de lésion et du nombre de neurones moteurs

Après coloration, les coupes de moelle épinière ont été photographiées sur un microscope Leica 2450 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne) pour quantifier les lésions et les pertes neuronales, tandis que les photos des résultats ont été prises sur un microscope Olympus BX63 (Olympus, Tokyo, Japon). Le pourcentage de surface lésée sur chaque coupe de moelle a été calculé grâce au programme Image J soit en calculant la lésion globale, soit en calculant séparément la surface lésée de substance blanche ou de substance grise. Ensuite la lésion a été exprimée sous forme graphique en fonction de l'extension rostro-caudale dans la moelle autour de l'épicentre. Le volume des lésions a également été calculé, en utilisant l'estimateur de Cavalieri ( $V = [\Sigma(A_1 + A_2 + \dots A_n) \times D] - [A_{\max} \times Y]$ ) où A représente la surface lésée, D la distance entre deux coupes et Y l'épaisseur d'une coupe (18). Enfin, le nombre de neurones survivants a été comptabilisé dans les moelles lésées et non lésées (éloignées de l'épicentre), permettant de visualiser l'évolution de la population neuronale autour de l'épicentre dans l'axe rostro-caudal. L'épicentre d'une lésion était défini comme l'endroit ayant le pourcentage de surface lésée le plus élevé et était choisi comme point 0 dans la représentation de l'extension rostro-caudale de la lésion.

### **2.5) Immuno-histochimie**

Pour étudier la distribution de l'HA dans les moelles épinières, nous avons réalisé un marquage histochimique en utilisant une protéine de liaison de l'HA : b-TSG6 (cordialement fourni par Halozyme Therapeutics, San Diego, Californie, USA) couplée à une biotine. La révélation du marquage incluait également, une streptavidine couplée à une peroxydase (Vectastain PK-4002, Labconsult, Bruxelles, Belgique) et du diaminobenzidine (DAB) (Dako, Heverlee, Belgique) comme substrat colorimétrique. Les échantillons étaient déparaffinés, placés dans 3 bains de glycine (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 1 de PBS et 1 de peroxyde d'hydrogène 3% (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) dilué dans du PBS afin de saturer la peroxydase endogène.

Les lames étaient ensuite rincées dans du PBS et étaient saturées par un bain de PBS-BSA 0,2% (Albumine Bovine heat shock isolation, Amresco, Solon, Ohio, USA) -Triton 0,1% (Triton x-100, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), à température ambiante. Elles étaient ensuite entourées au Dakopen (Dako, Glostrup, Danemark) et incubées overnight en présence de la b-TSG6 à concentration 1/500 en chambre humide à 4°C. Après rinçage dans le PBS, les échantillons étaient incubés avec la streptavidine-peroxydase 1/200 et après trois rinçages de PBS, le DAB était ajouté et une contre-coloration à l'hémalum était réalisée. Le tout était suivi d'une déshydratation (bains d'isopropanol et toluol) et d'un montage au DPX. Le protocole de cette manipulation était similaire pour les tissus coupés au cryostat ou enrobés en paraffine. A noter que les moelles des laminectomies du groupe 6 semaines ont été marquées par une autre protéine de liaison de l'HA biotinylée, Hyaluronic Acid Binding Protein Bovine Nasal Cartilage (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), utilisée à une concentration de 1/100. Le protocole restait tout à fait similaire à celui décrit ci-dessus. Ce changement est expliqué par le meilleur fonctionnement de cette dernière et l'épuisement des stocks de b-TSG6. Le contrôle positif utilisé était de la peau de souris processées de la même façon que les tissus et les contrôles négatifs étaient une moelle et une peau ne recevant pas la protéine de liaison mais seulement la streptavidine-peroxydase.

Les astrocytes matures ont ensuite été mis en évidence grâce au marquage de la protéine GFAP. La protéine GFAP ou glial fibrillary acidic protein est une des protéines majeures des filaments intermédiaires des astrocytes matures. Elle intervient dans divers procédés tels que le développement et la différenciation des astrocytes, l'organisation de la MEC, la potentiation synaptique à long terme, la régulation négative du développement des projections neuronales, la régénération des projections neurales, la régulation de l'uptake de neurotransmetteurs et la réponse aux blessures (52).

Les lames étaient tout d'abord déparaffinées par des bains successifs d'alcools (toluène, méthanol absolu, méthanol 70%) et passaient ensuite dans l'eau courante. Les coupes étaient ensuite démasquées pendant 10 minutes dans un tampon citrate 0.01M à pH6 (4,2g d'acide citrique.1H<sub>2</sub>O dans 3,8L d'H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt, Allemagne) porté à 100°C. Les lames étaient laissées à température ambiante une vingtaine de minutes et rincées dans l'eau distillée. L'anticorps primaire utilisé ici était un anticorps de souris, employé sur un tissu de souris, un kit spécial « Mouse on Mouse » (Vector laboratories, Inc., Burlingame, Californie, USA) était donc utilisé pour minimiser l'aspécificité. Les coupes étaient passées dans une solution bloquante d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour saturer la peroxydase endogène, rincées dans un tampon TBS pH 7,4 (6g Tris-HCl, 45g NaCl, 1L H<sub>2</sub>O) 2X2 minutes et chaque coupe de moelle était entourée au Dakopen. Les moelles étaient incubées 1 heure dans une solution de blocage Mouse IgG Blocking Reagent limitant l'aspécificité, rincées 2X2 minutes dans du TBS et incubées avec l'anticorps primaire souris anti-GFAP (1/100) (GA5, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) overnight. Le lendemain, les coupes étaient rincées 2X2 minutes dans du TBS et incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé 1/100 (IgG anti-mouse IgG, Vector laboratories, Inc., Burlingame, Californie, USA) durant 1 heure, rincées à nouveau et mis en présence d'une streptavidine-peroxydase (Vectastain peroxidase mouse IgG PK-4002, Labconsult, Bruxelles, Belgique) pendant 45 minutes. Les coupes étaient ensuite soumises à la révélation grâce au DAB, contre-colorées à l'hémalum, déshydratées dans des bains d'isopropanol et toluol et enfin montées au DPX. Le contrôle positif utilisé était du cerveau de souris processés de la même façon que les tissus. Les contrôles négatifs étaient une moelle et un cerveau ne recevant pas l'anticorps primaire mais seulement le secondaire et la streptavidine-peroxydase.

## **2.6) Double immunofluorescence : HA/GFAP ou HA/Iba1**

Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) est une protéine de liaison du calcium spécifique de la microglie et des macrophages. Elle détient une activité de regroupement de l'actine et participe aux mouvements des membranes et à la phagocytose dans la microglie activée (34).

Contrairement aux autres marquages, les coupes n'étaient ici ni soumises au chauffage de fixation au four à 48°C ni à l'étape de démasquage. Les lames étaient premièrement déparaffinées, rincées dans un bain de PBS et placées 2 minutes dans bain de glycine pH 7,2 à 3 reprises. Les coupes étaient ensuite rincées dans du PBS-0,2%BSA-0,02%Triton et saturées ensuite dans cette même solution durant 1 heure et entourées au Dakopen. Les tissus étaient mis en présence de l'anticorps primaire, overnight à 4°C : un anticorps GA5 mouse monoclonal anti-GFAP (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) dilution 1/100 et un anticorps polyclonal de lapin anti-Iba1 (Wako, Richmond, Virginie, USA) dilution 1/100. En ce qui concerne le marquage de l'HA, la HA binding protein utilisée pour les souris deux semaines post-opératoires étaient la protéine b-TSG6 biotinylée, celle-ci était utilisée à une dilution 1/500. Pour les tissus des souris 6 semaines post-opératoires, c'est la protéine Hyaluronic Acid Binding Protein Bovine Nasal Cartilage fut utilisée à une dilution 1/100. Après cette incubation, les coupes étaient rincées dans une solution de PBS-0,2%BSA-0,02%Triton et ensuite incubées avec l'anticorps secondaire durant 1 heure à 4°C : anticorps chèvre anti-souris-Alexa 594 (Life Technologies, Carlsbad, Californie, USA) dilution 1/100 pour GFAP, anticorps chèvre anti-lapin-Alexa 594 (Molecular probes Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) dilution 1/100 pour Iba1 et enfin une molécule de fusion streptavidine-FITC (fluoro isothiocyanate) (Vector laboratories, Burlingame, Californie, USA) pour l'HA. Les lames étaient ensuite de nouveau rincées dans le PBS-0,2%BSA-0,02%Triton, incubées avec un marqueur des noyaux, le Hoechst (Hoechst 33258, Molecular Probes Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (dilution 1/100 dans du PBS-0,2%BSA-0,02%Triton) pendant 15 minutes et enfin rincées, montées au Mowiol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) et conservées à 4°C. Le contrôle positif utilisé était de la peau et du cerveau de souris processés de la même façon que les tissus. Le contrôle négatif était une moelle, une peau et un cerveau ne recevant pas la protéine de liaison ou les anticorps primaires mais seulement la streptavidine-FITC ou les anticorps secondaires.

## **2.7) Etude d'expression génique des HA synthases et hyaluronidases**

### **2.7.1) Extraction d'ARN total**

La première étape consistait en l'extraction de l'ARN des échantillons de moelle à l'aide du kit Tripure and High Pure RNA Tissue (Roche, Bâle, Suisse). Les échantillons étaient transférés indépendamment dans des tubes vissés contenant des petites billes de céramique (eppendorfs et billes fournis dans le kit) et 1ml de Tripure (Ambion life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Les échantillons étaient ensuite homogénéisés dans un Magnalyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) (50 secondes à 6500tpm), machine qui permet aux billes de céramique de concasser le tissu par oscillations à haute vitesse. Le tube était ensuite laissé au repos à température ambiante pendant 5 minutes avant d'être centrifugé pendant 10 minutes à 13000 rpm et à 4°C.

Un lysat cellulaire était alors récupéré et 200µl de chloroforme RF (VWR chemicals Radnor, Pennsylvanie, USA) étaient ajoutés ensuite dans le tube. Celui-ci était alors vortexé vigoureusement durant 15 secondes, incubé à température ambiante pendant 3 minutes et centrifugé à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Un surnageant transparent était alors formé et devait être récupéré sans perturber les phases ! De 300 à 350 µl étaient obtenus et placés dans un nouvel eppendorf. Un volume équivalent d'éthanol 70% était ajouté. 700µl de ce mélange était transféré sur une colonne de purification d'ARN. L'ensemble était placé dans la centrifugeuse à 13000 rpm pendant 30 secondes. Le contenu de l'eppendorf était vidé et 100µl de DNase (90µl de DNase incubation buffer + 10µl de DNase (fournis dans le kit)) étaient ajoutés sur la colonne pour une incubation de 15 minutes à température ambiante. 500µl de Wash buffer I (kit) étaient ajoutés et la colonne était centrifugée à 10000 rpm durant 15 secondes. De nouveau le contenu de l'eppendorf était vidé et un autre composant était ajouté, le Wash buffer II (kit) : un premier ajout de 500µl suivi d'une centrifugation de 15 secondes à 10000 rpm et un second de 300 µl suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 13000 rpm. Le contenu récolté dans l'eppendorf était vidé après chaque étape. Enfin, la colonne était placée dans un nouvel eppendorf de 1,5 ml avec capuchon et 30µl d'elution buffer (kit) étaient placés dedans. La colonne subissait une centrifugation de 1 minute à 10000 rpm et l'ARN était alors récupéré dans l'eppendorf. Chaque échantillon était alors dosé au nano-drop (Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) la concentration devant être connue pour ajuster les concentrations des différents échantillons au même niveau lors des manipulations ultérieures (qPCR). En attendant, ces ARNs étaient conservés à -80°C.

### **2.7.2) Reverse Transcription**

Dans un premier temps, il était nécessaire de calculer les volumes d'H<sub>2</sub>O RNase free et de solutions stocks d'ARN à employer, tous les échantillons devant avoir une même concentration dans un volume final fixe de 11µl.

Une fois les échantillons mis à concentration (dans des eppendorfs 20µl), le premier mix était préparé : 1µl de mix de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) 0,1µl de poly dT (amorce de la première étape qui se fixe à la queue polyA des ARNm, permettant de faire la reverse transcription des ARNm de manière ciblée) (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) et 0,9µl d'H<sub>2</sub>O RNase free par échantillon. Dans chaque tube était ajouté 2µl de ce mix 1 préalablement vortexé. Le tout était alors vortexé et placé 5 minutes à 65°C dans un Thermocycler (Thermol cycler 2720, Applied Biosystems, Life Technologies, Bleiswijk, Pays-Bas) pour permettre l'hybridation de l'amorce poly dT, avant d'être laissé au repos dans la glace afin de refroidir. Le deuxième mix était alors préparé, composé de 4µl de tampon (first strand buffer 5X), de 2µl de DDT 0,1M 10X, de 0,1µl de l'enzyme reverse transcriptase (tous 3 de Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) et enfin de 0,9µl d'H<sub>2</sub>O RNase free, par échantillon. 7µl de ce mélange étaient ajoutés par eppendorf et ceux-ci étaient vortexés, centrifugés et à nouveau placés dans le Thermocycler pour trois étapes : 50 minutes à 42°C, 10 minutes à 70°C et ensuite à 4°C durant quelques minutes. Chaque échantillon était alors dilué 20 fois pour obtenir des mixs d'ADNc prêts à l'emploi pour les PCR's quantitatives, le tout conservé à -25°C.

### Liste des primers utilisés

<u>Gènes</u>	<u>Séquences</u>
Mouse HYAL1	sens : 5'-TGCCCGTAATGCCCTACGT-3' antisens : 5'-GCTGTGCTCCAGTTCCTCCA-3' Fragment amplifié : 77 pb NM_008317
Mouse HYAL2	sens : 5'-AGCCAGGTGGACCTTATCTCTA-3' antisens : 5'-TTCTTGAGGTATTGGCAGGTCT-3' Fragment amplifié : 119 pb NM_010489
Mouse HAS1	sens : 5'-CAAGACGGAGAAGAGAGAATCC-3' antisens : 5'-CTGAGGGCTTTGGCATGT-3' Fragment amplifié : 66 pb NM_008215
Mouse HAS3	sens : 5'-GATGTCCAAATCCTCAACAAG-3' antisens : 5'-CCCACTAATACATTGCACAC-3' Fragment amplifié : 126 pb NM_008217
Mouse HPRT	sens : 5'-GGACCTCTCGAAGTGTTGGAT-3' antisens : 5'-CCAACAACAACTTGTCTGGAA-3' Fragment amplifié : 70 pb NM_013556



### **2.7.3) PCR quantitative**

L'expression génique des HAS1 et 3, des HYAL 1 et 2 et de HPRT a été étudiée, celle de HAS2 n'a pu être investiguée devant la difficulté de trouver des primers efficaces pour la détecter. Les primers HYAL2 et HPRT furent designés par nos soins via les programmes Primer3 et Primer-BLAST. Les autres séquences nous ont été cordialement fournies par Vanessa Colombaro (PhD. Student, Laboratoire de physiologie générale, URPhyM, UNamur).

Ces primers (Eurogentec, Liège, Belgique) étaient utilisés à une concentration finale de 300nM.

HPRT nous a servi de gène de référence pour nos PCR's quantitatives. Il s'agit du gène de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyle transférase (53). Comme son nom l'indique, il s'agit d'une transférase qui catalyse la conversion de l'hypoxanthine en inosine monophosphate et la guanine en guanosine monophosphate par un transfert d'un groupe 5-phosphoribosyle provenant du 5-phosphoribosyle 1-pyrophosphate (53). Elle joue donc un rôle central dans la génération de nucléotides de type purine à travers la voie de recyclage des purines (53).

L'appareil employé était le Light Cycler 96 (Roche, Bâle, Suisse). Une plaque qPCR 96 puits (qPCR 96-well plate for Roche LC480, Eurogentec, Liège, Belgique) était placée sur un support plastique lui-même placé sur de la glace fondante. Tout d'abord, le mix de réaction était préparé pour chaque gène étudié, avec 10µl de Sybr green (Fast-Start Universel Sybr Green master (Rox.), Roche, Bâle, Suisse ou Takyon Rox Sybr Green master mix blue dTTP, Eurogentec, Liège, Belgique) (contenant les réactifs ainsi que le SYBR Green), 2,5 µl de primers sens et 2,5µl de primers antisens. 15 µl étaient ajoutés dans chaque puits. Ensuite, 5µl d'ADNc d'échantillon étaient ajoutés dans les puits correspondants, en tenant compte du fait que chaque échantillon devait être étudié en duplicat pour le gène d'intérêt ainsi que pour le gène de référence (HPRT). La plaque était ensuite couverte d'un film transparent (Light cycler 480 Sealing Foil, Roche, Bâle, Suisse) de manière hermétique. Cette plaque était ensuite mise dans une centrifugeuse durant 3 minutes et placée dans la machine pour la lecture. Le programme de cycle PCR comprenait une préincubation (95°C durant 600 s, dénaturation), une amplification (cycles de 10 secondes à 95°C (dénaturation) et 30 secondes à une température correspondante à la température moyenne de melting des primers utilisés sur la plaque (hybridation/élongation), un melting (95°C durant 10s, 60s à 65°C et 1s à 97°C, mesure de la taille des amplicons) et une phase de cooling (30s à 37°C, refroidissement).

## **2.8) Dosage du contenu intramédullaire en HA**

### **2.8.1) Préparation des échantillons**

Les échantillons devaient tout d'abord subir une étape de lyophilisation. Pour cela, des eppendorfs à capuchon vissé étaient préparés pour chaque échantillon : chaque tube était pesé à vide, le capuchon était troué. Les échantillons étaient placés dans le lyophilisateur pour une durée de 24 heures avant d'être pesés à nouveau afin de connaître la masse sèche de chaque échantillon (permettant de standardiser les quantités d'HA mesurées par la masse des échantillons). Un capuchon non-troué était utilisé et les échantillons étaient digérés en utilisant l'enzyme pronase (Protease from streptomyces griseus, P5147-5G, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) (3mg/ml dans un tampon ammoniac/acidique formique 100mM pH 7 à 8) durant 24 heures dans un four à 55°C, les tubes étant placés sur une structure rotative permettant d'optimiser la digestion. Après ces 24 heures, la pronase devait être inactivée via un chauffage à 100°C au bain marie durant 15 minutes suivi d'une période de refroidissement et d'une seconde lyophilisation (utilisation du capuchon troué de nouveau) qui permettait de récupérer une poudre, conservée au congélateur à -80°C en attendant leur resuspension dans l'eau distillée et leur analyse.

### **2.8.2) Dosage de l'HA en sandwich sur mini-plaque**

Ce dosage était réalisé dans des mini-plaques 96 puits (microplate 96-well, Greiner bio-one, Kremsmünster, Autriche) en utilisant un kit de dosage de l'HA (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, USA). 50µl de réactif de capture (5ml de PBS + 20µl d'aggrécane) étaient ajoutés dans chaque puits, la plaque était couverte d'un parafilm et laissée en incubation overnight. Le lendemain, la plaque était rincée 3 fois à l'aide de 125µl de Wash buffer (500ml de PBS + 250µl de Tween 20) et ensuite bloquée avec 150µl de Block buffer (28,5ml de PBS + 1,5ml de Tween 20 + 15µg de NaN<sub>3</sub>) pendant une heure, scellée par un parafilm. Les échantillons resuspendus étaient dilués 1000X dans du Reagent Diluent (30ml de PBS + 1,5ml de Tween 20), le standard était dilué de manière sériée à partir d'une concentration de base de 90µg/ml, diluée à chaque fois d'un facteur 3 de telle sorte d'obtenir 6 concentrations différentes et décroissantes qui après analyse permettaient la construction de la droite d'étalonnage. La plaque était rincée à nouveau 3 fois avec 125µl de Wash buffer et les échantillons et standards dilués étaient ajoutés dans les puits à raison de 50µl par puits (puits présents en duplicats) avant de refermer à nouveau la plaque au parafilm et de laisser incuber 2 heures. A nouveau un triple rinçage était réalisé et 50µl d'un réactif de détection (5ml de Reagent Diluent + 20µl de Detection reagent (aggrécane biotinylé)) étaient placés dans les puits, la plaque était couverte et laissée en incubation durant 2 nouvelles heures. Après un nouveau triple rinçage, 50µl de streptavidine-horse radish peroxydase étaient ajoutés dans chaque puits, la plaque était à nouveau couverte et laissée en incubation 20 minutes à l'abri de la lumière. Enfin, après un dernier rinçage, la solution substrat chromogène était ajoutée (50µl/puits). La plaque était alors laissée en incubation 20 minutes à l'abri de la lumière avant que la réaction ne soit bloquée par une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N et qu'elle ne soit lue (Versa max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, Californie, USA) à 450 et 570nm (les valeurs mesurées à 570nm étaient soustraites des valeurs obtenues à 450nm).

## **2.9) Dosage de l'HA dans des cultures astrocytaires**

La sécrétion d'HA fut également investiguée dans des cultures cellulaires d'astrocytes, obtenus à partir de précurseurs gliaux dans des conditions contrôlées, après stimulation mécanique lors d'un scratch assay (explication dans la section suivante) ou après stimulation au lipopolysaccharide (LPS).

### **2.9.1) Culture d'astrocytes à partir de précurseurs gliaux**

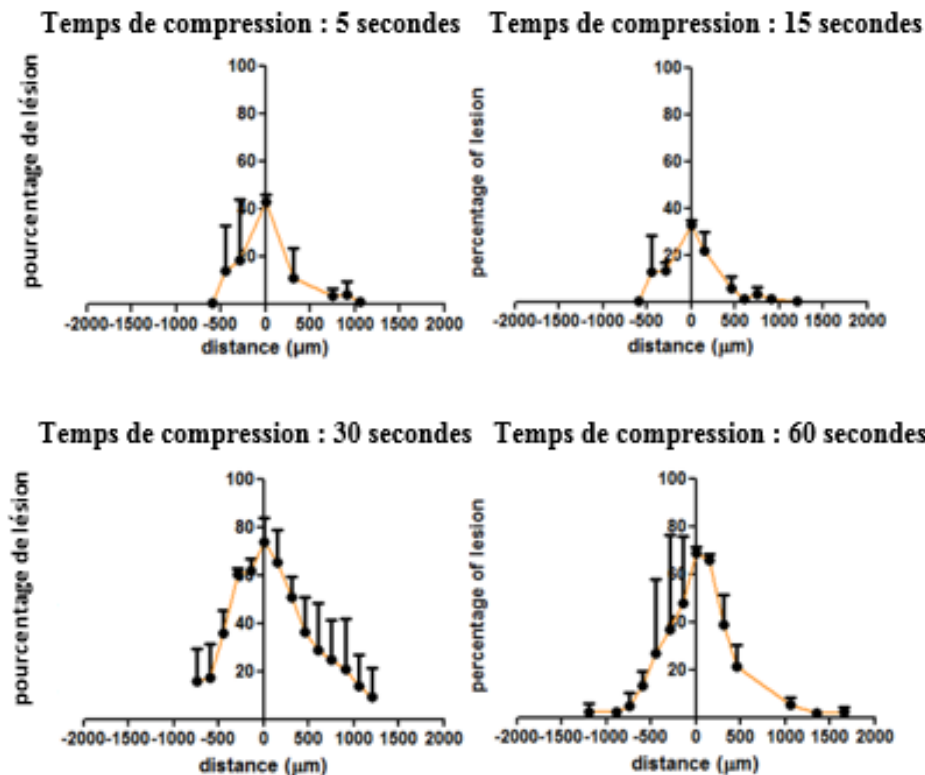
Les cellules utilisées étaient des précurseurs gliaux de rats, des cellules appelées GRP (Glial-Restricted Precursor, Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA)), des cellules souches multipotentes ayant la possibilité de se différencier soit en astrocytes, soit en oligodendrocytes. Pour favoriser l'adhésion et la croissance des cellules, les boîtes de culture étaient coatées avant leur utilisation avec de la poly-L-lysine 15µg/ml (Sigma # P1274, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) et de la laminine 15µg/ml (Thermo #23017-015, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)). La poly-L-lysine était tout d'abord placée dans la boîte T-75, incubée à 4°C overnight, ensuite la solution était aspirée et la boîte rincée 2 fois au PBS. La boîte était incubée 2 heures à 37°C avec la laminine et aspirée ensuite avant 2 nouveaux rinçages au PBS. Finalement, du milieu HBSS était ajouté pour maintenir la boîte humide.

Les cellules étaient cultivées et différenciées dans les boîtes T-75 avant d'être mises en culture sur lame couvre-objet dans des boîtes 6 puits. Les lames couvre-objets étaient stérilisées au four (2 heures à 100°C) avant d'ajouter la poly-L-lysine durant 30 minutes à température ambiante et elles étaient lavées dans du PBS. Le milieu employé pour la culture des GRP's était composé de DMEM/F12 (Thermo Fisher #11320-074) auquel étaient ajoutés une solution de Pen-Strep (mélange d'antibiotiques pénicilline/streptomycine) 1/100 (Thermo Fisher #12587-010), de la BSA 1mg/ml (Sigma #A2153), du B27-supplément 1/50 (Thermo Fisher #12587-010) et du FGF-2 10ng/ml (Peprotech #100-18B Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA). Lors de la décongélation, le cryotube était décongelé au bain marie à 37°C. Ensuite, 1ml de milieu chaud était ajouté goutte à goutte. La suspension de cellules était ensuite transférée dans un tube avec 10 ml de milieu préchauffé. Après centrifugation (1000 rpm durant 5 minutes à température ambiante), le surnageant était aspiré et les cellules resuspendues dans 1ml de milieu. Cette étape permettait de disposer de cellules pour effectuer un comptage au bleu de trypan et ainsi pouvoir calculer la quantité de cellules disponibles pour ensemercer les boîtes pré-coatées avec une densité cellulaire choisie : entre 30 000 à 40 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Le milieu était changé après 24 heures maximum, avant d'être renouvelé tous les deux jours par la suite. Les cellules étaient ainsi conservées en incubateur et séparées lorsqu'elles atteignaient une confluence comprise entre 70 et 90%. Pour réaliser cette étape, le milieu était aspiré et le support était rincé avec du PBS sans Mg et Ca (Thermo Fisher #14190-094). Les cellules étaient détachées à l'aide d'1 ml de Trypsine/EDTA 0,05% (Thermo Fisher #25300-054) en laissant incuber durant 2-3 minutes avant d'être arrêté en ajoutant 3ml de milieu chaud et rincé ensuite le flask 2 fois avec du milieu. Le tout était ensuite centrifugé à 1000rpm durant 5 minutes avant d'aspirer le surnageant, laver les cellules avec du milieu et de centrifuger à nouveau à 1000rpm pendant 5 minutes pour finalement resuspendre les cellules dans 1ml (ou dans des volumes plus importants selon la capacité de prolifération des cellules) pour réaliser un comptage. Les cellules étaient réensemencées dans du milieu complet, c'est-à-dire avec du FGF-2, et le milieu devait être changé toutes les 24 heures.

Enfin, pour différencier les cellules GRP en astrocytes, les cellules GRP étaient mises en présence du milieu utilisé précédemment, mais en remplaçant le FGF-2 par un autre facteur de croissance : le BMP4 (bone morphogenetic protein 4) (Peprotech #120-05) 10ng/ml (resuspendu dans 50µl d'acide citrique 10mM stérile et 50µl de GRP basal medium sans FGF-2). Cette différenciation était lancée 24 heures après l'ensemencement en changeant le milieu de base par celui de différenciation. A nouveau ce milieu était remplacé tous les 2 jours. Dans ce milieu de différenciation, les cellules GRP changeaient petit à petit de morphologie pour devenir des astrocytes au bout de 7 jours.

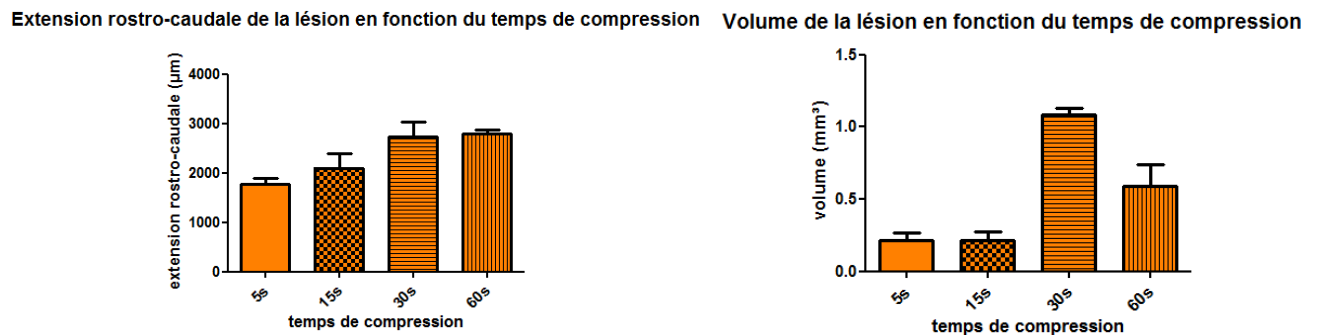
### **2.9.2) Double immunofluorescence GFAP/A2B5**

Les cellules étaient tout d'abord rincées avec du PBS et fixées durant 15 minutes avec de la PFA4%. Après un double rinçage au PBS, les cellules étaient rincées 3 fois 2 minutes dans de la glycine et étaient soumises à une saturation dans du PBS-BSA 0,2% - Triton 0,02% durant une heure. Les anticorps primaires étaient ensuite ajoutés : un anticorps polyclonal de lapin anti-GFAP dilution 1/100 (Z0334, Dako, Carpinteria, Californie, USA) et un anticorps de souris anti-A2B5 dilution 1/100, mélangé à du glycérol 1/50 (mAb 4D4 (A2B5-like) mouse, DSHB, University of Iowa, Iowa city, Iowa, USA). L'incubation avait lieu overnight à 4°C. Le lendemain, 3 rinçages au PBS- BSA 0,2%- Triton 0,02% étaient réalisés et les cellules étaient incubées avec les anticorps secondaires durant 1 heure à température ambiante : un anticorps anti-souris vert 1/1000 (Life Technologies, Carlsbad, Californie, USA) et un anti-lapin rouge 1/1000 (Life Technologies, Carlsbad, Californie, USA). Les cellules subissaient à nouveau 3 rinçages au PBS- BSA 0,2%- Triton 0,02% puis une incubation avec du Hoechst dilution 1/100 dans du PBS-BSA 0,5%- Triton 0,02% pendant 15 minutes. Après un dernier cycle de 3 rinçages dans du PBS- BSA 0,2%- Triton 0,02%, les lamelles étaient montées sur lame au mowiol et conservées à 4°C.



**Figure 1 :** Pourcentage de la surface du tissu médullaire lésée chez des souris ayant subi une compression médullaire durant 5 (a), 15 (b), 30(c) et 60 secondes (d). Résultats : moyenne, les barres d'erreur représentent la déviation standard, n=2 dans chacun des groupes.

Les échantillons de moelle épinière étaient immergés dans l'OCT et coupés au cryostat en coupes de 30μm d'épaisseur. Ces coupes ont été colorées successivement à l'Eriochrome C et au Crésyl violet et le pourcentage de surface lésée en fonction de l'extension rostro-caudale de part et d'autre de l'épicentre a été déterminé via le programme Image J. L'épicentre était défini comme la coupe avec le plus grand pourcentage de surface endommagée. Ces résultats sont peu informatifs étant donné le faible nombre d'individus dans chacun des groupes (2), mais ils nous ont permis de choisir un temps de compression adéquat pour nos expérimentations suivantes. Cependant, nous pouvons observer que le pourcentage de tissu blessé était plus élevé dans les longs temps de compression (c et d) que dans les temps plus courts (a et b) bien que ces résultats ne peuvent être significatifs.



**Figure 2:** Extension rostro-caudale et volume de la lésion médullaire en fonction du temps de compression utilisé. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=2 dans chaque groupe.

### **2.9.3) Dosage du relargage d'HA dans le milieu extracellulaire**

Les cellules différenciées étaient utilisées pour réaliser des mesures de la quantité d'HA produite dans des conditions basales ou stimulées. Pour cela, les cellules astrocytaires différenciées à partir des GRP's étaient ensemencées dans des boîtes 6 puits. Une colonne de puits était réservée aux contrôles (cellules sans stimulation inflammatoire), les autres recevaient une stimulation : soit une dose de LPS (0,1 ou 1 µg/ml), soit un scratch.

Pour réaliser un scratch, le fond du puits était griffé à l'aide d'un tips de pipette de 100µl à 2 reprises : l'une du nord au sud et l'autre d'est en ouest. Le tapis cellulaire était alors rompu, des cellules étaient lésées (figure 27b). Les trois puits de chaque colonne (une colonne par condition) permettaient des prélèvements de milieu à différents timings post-stimulation : 1, 2 ou 4 jours. Lors de ces prélèvements, 1ml de milieu était conservé à -20°C pour le dosage de l'HA et le reste était récupéré après lyse des cellules et conservé à -80°C pour servir à l'extraction et au dosage d'ARN. Ce procédé a permis de standardiser les quantités d'HA mesurées par rapport à la quantité d'ARN total (supposément proportionnelle au nombre de cellules présentes dans les puits).

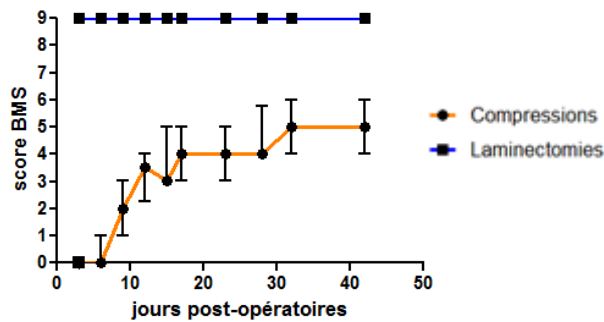
L'ARN fut extrait en utilisant le kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Bâle, Suisse), la manipulation était similaire à celle employée pour l'extraction d'ARN à partir des lysats de moelles et les ARN une fois extraits ont été dosés au Nanodrop.

En ce qui concerne le dosage HA proprement dit, le protocole employé était tout à fait similaire à celui utilisé pour le dosage sur les échantillons de moelles lyophilisés si ce n'est que le dosage a été réalisé sur des extraits de milieux non-dilués.

### **2.10) Statistiques**

L'ensemble des tests statistiques ont été réalisés en employant le test de Mann-Whitney, permettant ainsi à chaque test de comparer deux groupes d'échantillons : lésés/contrôles non lésés ou lésion 2 semaines post-opératoires/lésion 6 semaines post-opératoires.

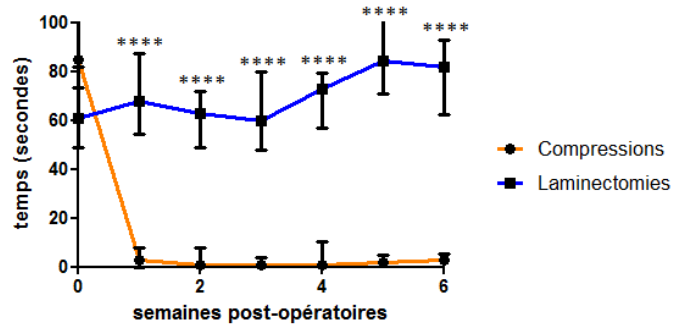
### Evolution du score BMS au cours des jours post-opératoires



**Figure 3:** Résultats obtenus par les souris contrôles et lésées conservées durant 6 semaines post-opératoires lors du test de la BMS (Basso-Mouse-Scale). Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=16.

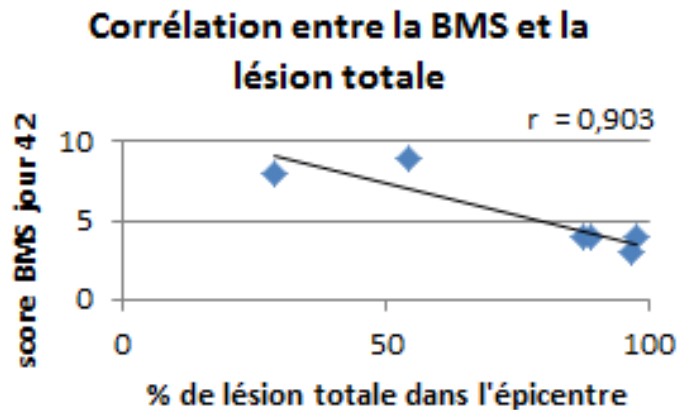
Cette échelle évalue les paramètres physiques développés par les membres postérieurs des individus traumatisés. Ce test est réalisé chaque jour et attribue un score compris entre 0 et 9, selon la mobilité des membres et les postures prises par l'animal, allant d'une absence totale de mouvement des membres postérieurs (0) à une marche et une posture normale (9). Les contrôles ne montrent aucune atteinte au fonctionnement de leurs membres postérieurs, tandis que les souris lésées montrent une paralysie temporaire, qui s'améliore ensuite au fur et à mesure des jours, jusqu'à atteindre une valeur médiane d'environ 5.

### Résultats du Rotarod



**Figure 5:** Résultats obtenus au test du Rotarod par les souris lésées et contrôles avant et après l'opération. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=13 (compressions), n=15 (laminectomies). Statistiques : \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , test de Maan-Withney.

Les résultats montrent une chute dramatique des performances des individus lésés de manière définitive. La coordination des membres de ces individus n'est donc pas récupérée malgré un retour des capacités de mouvements.



**Figure 4:** Corrélation entre le score final de BMS obtenus au 42<sup>ème</sup> jour post-opératoire et le pourcentage de lésion totale dans l'épicentre des moelles compressées.

Le graphique nous montre une bonne corrélation entre ces deux paramètres, des résultats semblables ont été obtenus dans la comparaison de la BMS avec la lésion dans les substances blanche et grise au niveau de l'épicentre ainsi qu'avec le volume de lésion.

### **3. Résultats**

#### **3.0) Mise au point du modèle de traumatisme médullaire**

Lors de nos tests préalables visant à déterminer le temps de compression idéal, 4 groupes de 2 animaux ont subi une compression de la moelle durant des temps différents : 5, 10, 30 et 60 secondes. La taille et le volume de la lésion ainsi que le pourcentage de surface totale de moelle lésée en fonction de la distance autour de l'épicentre de la lésion, dans l'axe rostro-caudal ont été évalués dans les différents groupes (figures 1 et 2). Nous avons constaté une grande différence du pourcentage de surface lésée entre les temps 15 secondes et 30 secondes mais peu de différences entre 5 et 15 secondes ou entre 30 secondes et 1 minute. Nous avons donc décidé de conserver 30 secondes comme temps de compression pour nos expériences ultérieures : ce timing étant un bon compromis représentant une durée suffisante pour créer une lésion histopathologique significative dans les substances grise et blanche ainsi que des déficits fonctionnels durables et évaluables. De plus, comprimer la moelle plus longtemps semblait changer peu de choses. Ces conclusions ont été confirmées avec l'évaluation de l'extension rostro-caudale de la lésion et du volume lésé dans la moelle en fonction du temps de compression (figure 2). Malgré le faible nombre d'individus employés, cette expérimentation préliminaire nous a permis de choisir un temps de compression approprié.

#### **3.1) Caractérisation fonctionnelle**

Quatre types de tests comportementaux ont permis de caractériser les animaux traumatisés du point de vue de leurs performances motrices.

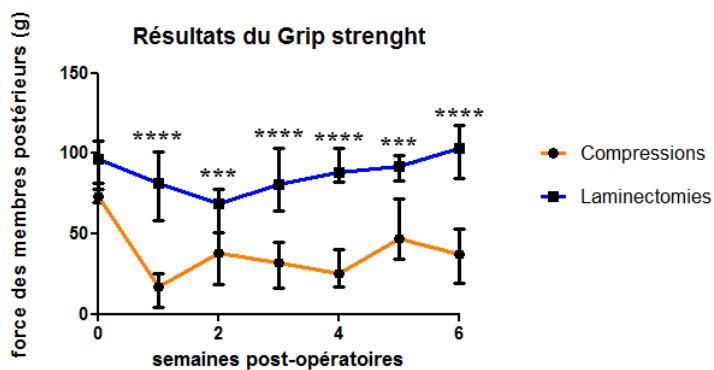
##### **Basso-Mouse-Scale (BMS)**

Les individus conservés 6 semaines après l'opération ont été examinés chaque jour durant cette période afin de leur attribuer un score selon la BMS (figure 3). Les souris ayant subi une compression médullaire ont montré une paralysie totale au minimum durant les trois premiers jours, date à laquelle, certaines améliorations de posture ont pu être constatées chez certains animaux. Peu à peu, les souris ont retrouvé une motricité au cours du temps atteignant un score médian d'environ 5 après les 6 semaines. Un seul animal a retrouvé une motricité suffisante que pour se voir attribuer un score maximum de 9 tandis que les animaux avec le score minimal se sont vu attribuer un 3, les autres oscillant entre ces deux extrêmes. Après 11 jours, plus aucun animal ne montrait de paralysie totale. Concernant les contrôles laminectomies, tous les animaux montraient une motricité normale le jour suivant l'opération. De plus, nos analyses montrent que le résultat final de BMS (au 42<sup>ème</sup> jour post-opératoire) est corrélé au pourcentage de surface de moelle lésée totale dans l'épicentre (figure 4) ainsi qu'au pourcentage des substances grise et blanche lésées dans l'épicentre et au volume lésé (données non-présentées).

##### **Le Rotarod**

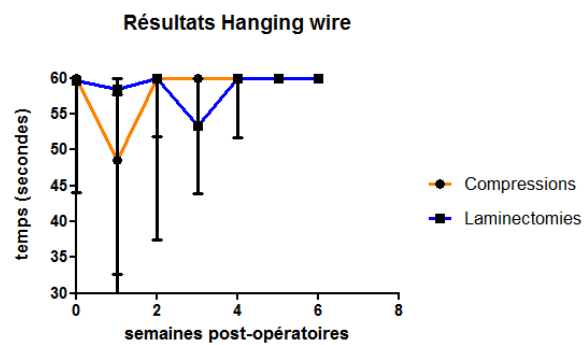
Les résultats du Rotarod nous démontrent que les capacités de déplacement sur une structure en mouvement avaient dramatiquement diminué chez les animaux lésés par rapport





**Figure 6:** Résultats obtenus au test Grip strength par les souris lésées et contrôles avant et après l'opération. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=16 (compressions), n=14 (laminectomies). Statistiques : \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ , test de Maan-Withney.

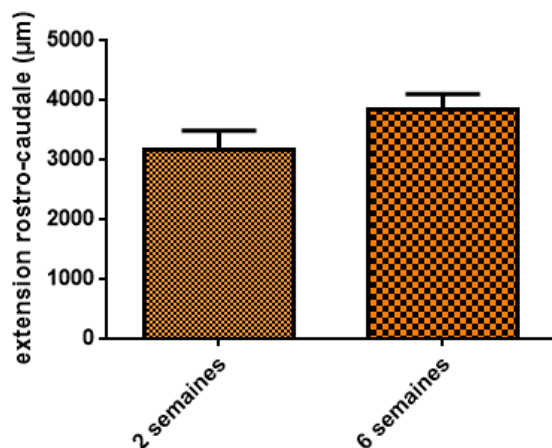
La force des membres postérieurs des souris lésées est fortement diminuée par rapport aux contrôles, cette différence est significative à tous les timings étudiés. La récupération de la force des membres temporairement paralysés n'est donc que partielle.



**Figure 7:** Résultats obtenus au test Hanging wire par les souris lésées et contrôles avant et après l'opération. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=16 (compressions), n=14 (laminectomies).

Les résultats obtenus montrent une légère diminution des performances des animaux lésés par rapport aux contrôles durant la première semaine qui suit l'opération, cependant celle-ci reste non significative. A partir de la deuxième semaine, les résultats obtenus sont déjà tout à fait normaux. Cette faible chute de performances s'explique par la force des membres antérieurs qui viennent suppléer les membres postérieurs.

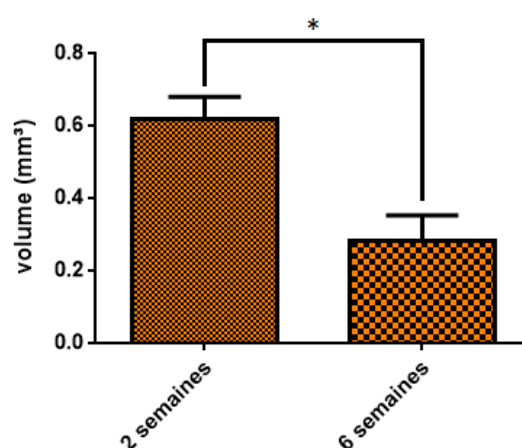
## Extension rostro-caudale de la lésion médullaire



**Figure 8:** Extension rostro-caudale de la lésion en fonction du temps après l'opération. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=3 (2 semaines) et n=6 (6 semaines).

La taille de la lésion a été estimée en tenant compte des espaces séparant les coupes lésées les plus rostrales et caudales. Aucune différence significative n'a pu être décelée entre les deux groupes en termes de taille.

## Volume de la lésion médullaire



**Figure 9:** Volume de la lésion médullaire en fonction du temps après l'induction de la lésion. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=3 (2 semaines) et n=6 (6 semaines). Statistiques : \* :  $p < 0,05$ , test de Maan-Withney.

Le volume de la lésion a été estimé chez chaque individu conservé 2 ou 6 semaines par la méthode de Cavalieri (voir Matériel et méthodes) et comparé entre les deux groupes. Les surfaces lésées de chaque tranche, nécessaires à cette estimation, ont été mesurées par le programme Image J après coloration du tissu à l'Eriochrome C et Crésyl violet. Le volume de la lésion est significativement plus faible après 6 semaines post-opératoires qu'après 2 semaines.

aux laminectomies (figure 5). Ces derniers ne montraient aucune baisse de capacité mais plutôt une amélioration au cours du temps, probablement due à l'entraînement hebdomadaire des animaux. Il semble donc que la coordination des animaux soit fortement perturbée après cette compression médullaire et même que la récupération de cette coordination soit très minime voire absente.

### **Le Grip strength**

On peut constater une différence très hautement significative dans les performances physiques réalisées sur le Grip strength entre les animaux lésés et contrôles (figure 6). Ces derniers montraient une faible diminution de leur capacité, temporaire, peut-être due aux dégâts provoqués lors de l'opération au niveau de leurs muscles dorsaux, dégâts qui pourraient les handicaper dans la réalisation de tractions sur la grille de l'appareil. Leur capacité était ensuite totalement retrouvée. Les animaux lésés montraient une récupération partielle de leur capacité initiale (entre 56 et 66% de leur capacité de départ).

### **Le Hanging wire**

Les mesures des performances motrices réalisées au Hanging wire ne permettent pas de mettre en évidence une quelconque différence entre les individus traumatisés et contrôles (figure 7). Ce test s'est révélé trop peu sensible et beaucoup trop influencé par les capacités motrices des membres antérieurs des animaux testés ; il est donc considéré comme inadéquat.

## **3.2) Caractérisation morphologique**

### **Extension rostro-caudale de la lésion**

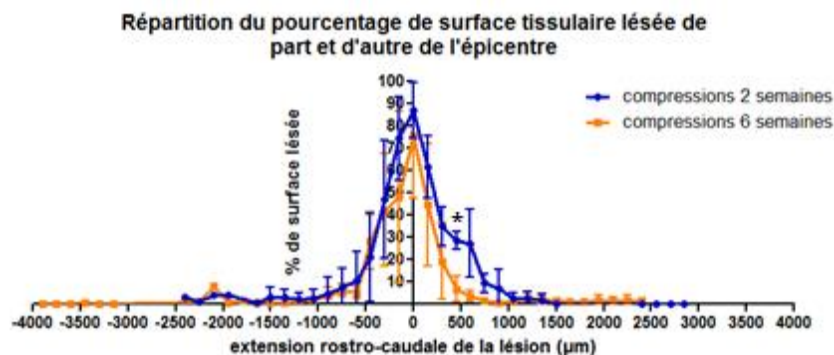
Au niveau de la taille de la lésion, une différence significative n'a pas pu être démontrée entre les lésions mesurées 2 semaines après l'opération et celles mesurées 6 semaines après l'opération (figure 8). Celle-ci varie entre 2,4 et 4,9 mm, cette mesure prenant en compte des lésions allant des dégâts importants rencontrés dans l'épicentre jusqu'aux dégâts plus discrets sous forme de vacuolisations légères, visibles à des distances plus importantes de l'épicentre.

### **Volume de lésion**

Contrairement à la taille des lésions, les mesures du volume de moelle épinière lésée montrent une différence significative entre les individus conservés 2 semaines et 6 semaines (figure 9). Dans le premier cas, ce volume lésé atteint une médiane de 0,619 mm<sup>3</sup> pour 0,283 mm<sup>3</sup> dans le cas des moelles conservées 6 semaines. Il semble donc qu'il y ait eu un phénomène de rétraction entre les deux timings de mesure.

### **Surface totale lésée**

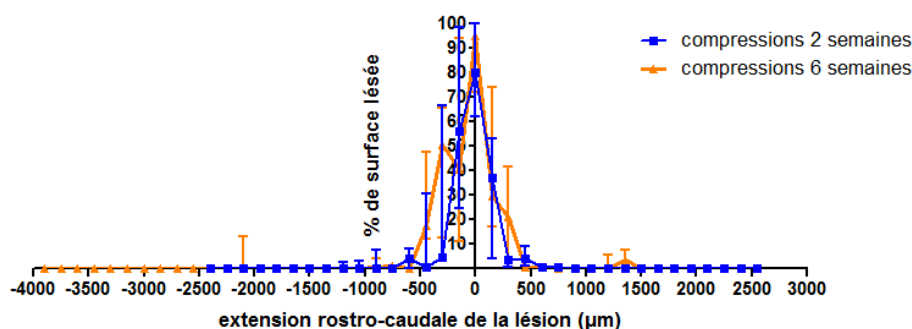
Au niveau de la surface de moelle épinière lésée le long de l'axe rostro-caudal, les lésions restent tout à fait comparables entre les moelles prélevées à 2 semaines post-opératoires et celles à 6 semaines excepté dans une petite portion située de 300µm à 600µm de l'épicentre



**Figure 10: Répartition du pourcentage de surface tissulaire lésée de part et d'autre de l'épicentre (0). Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=3 (2 semaines) ou n=6 (6 semaines). Statistiques : \* :  $p < 0.05$ , test de Maan-Withney.**

Cette surface lésée a été calculée à partir des coupes de moelle colorée à l'Eriochrome C/ Crésyl violet et via le programme Image J. Cette analyse montre que cette surface lésée est similaire dans les moelles lésées après 2 et 6 semaines post-opératoires excepté dans une zone entre 450 et 900µm plus rostrale que l'épicentre, cette différence est d'ailleurs significative à 450µm.

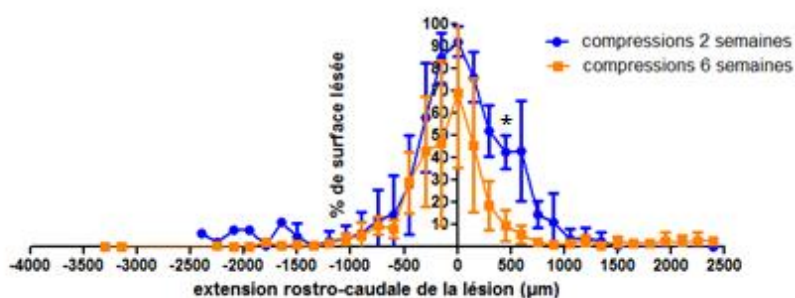
#### Répartition du pourcentage de surface tissulaire lésée dans la substance grise de part et d'autre de l'épicentre



**Figure 11: Répartition du pourcentage de surface tissulaire lésée dans la substance grise de part et d'autre de l'épicentre (0). Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=3 (2 semaines), n =6 (6 semaines).**

Cette surface lésée a été calculée à partir des coupes de moelle colorée à l'Eriochrome C/ Crésyl violet et via le programme Image J. L'analyse ne montre pas de différence significative entre les moelles lésées prélevées à 2 et 6 semaines.

#### Répartition du pourcentage de surface tissulaire lésée dans la substance blanche de part et d'autre de l'épicentre



**Figure 12: Répartition du pourcentage de surface tissulaire lésée dans la substance blanche de part et d'autre de l'épicentre (0). Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=3 (2 semaines), n =6 (6 semaines). Statistiques : \* :  $p < 0.05$ , test de Maan-Withney.**

Cette surface lésée a été calculée à partir des coupes de moelle colorée à l'Eriochrome C/ Crésyl violet et via le programme Image J. L'analyse montre une différence entre les moelles prélevées à 2 et 6 semaines, particulièrement dans une zone située entre 300 et 900µm de l'épicentre du côté rostral, cette différence est significative à 450µm.

dans la région plus rostrale (figure 10). On observe ainsi une même tendance d'évolution de la surface lésée avec un maximum de dégâts au niveau de l'épicentre (de par sa définition) et qui s'étend ensuite de part et d'autre de cet épicentre, dans les régions caudales et rostrales. La partie majoritaire des dégâts semble se situer sur une distance de 1mm répartie de part et d'autre de l'épicentre. Les moelles 2 semaines post-opératoires ont une surface lésée oscillant entre 75 et 100%, les 6 semaines, beaucoup plus variable, entre 29 et 98%. Les conséquences d'une compression médullaire induite durant un temps fixé génèrent donc des lésions très hétérogènes en fonction des individus. Cet effet est probablement dû à 2 phénomènes : la variabilité inter-individuelle chez les animaux et de manière plus prépondérante, le manque de reproductibilité de la part de l'expérimentateur lors de l'induction de la lésion.

#### Surface de substance grise lésée

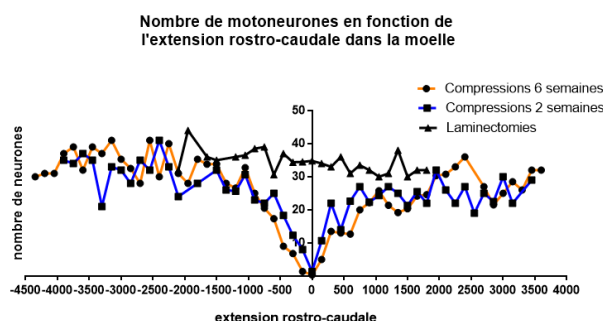
On peut constater que les mesures de surfaces lésées dans la substance grise tout au long de la moelle ne permettent pas de différencier les moelles prélevées à 2 et 6 semaines, les courbes étant à peu de choses près, totalement identiques (figure 11). Le tissu de la substance grise semble toujours aussi dégradé, avec en moyenne 80% du tissu dégradé dans l'épicentre des moelles 2 semaines et 86% pour les 6 semaines.

#### Surface de substance blanche lésée

Contrairement à l'analyse des surfaces totales et de substance grise lésées, la mesure de la substance blanche lésée nous montre une grande différence entre les moelles prélevées à 2 et 6 semaines (figure 12). En effet, la surface lésée dans cette région apparaît nettement moins importante chez le groupe 6 semaines et ce, sur une distance de plus de 1mm comprenant l'épicentre. Cette différence est d'ailleurs significative à 450µm de l'épicentre en rostral. La médiane de surface lésée dans cette région atteignait 92% dans le groupe 2 semaines alors qu'elle atteint 69% dans le groupe 6 semaines. C'est probablement cette différence de surface lésée qui est à l'origine de la différence significative de volume lésé entre les deux groupes, la lésion de la substance grise variant peu entre les deux.

#### Dénombrement des motoneurones

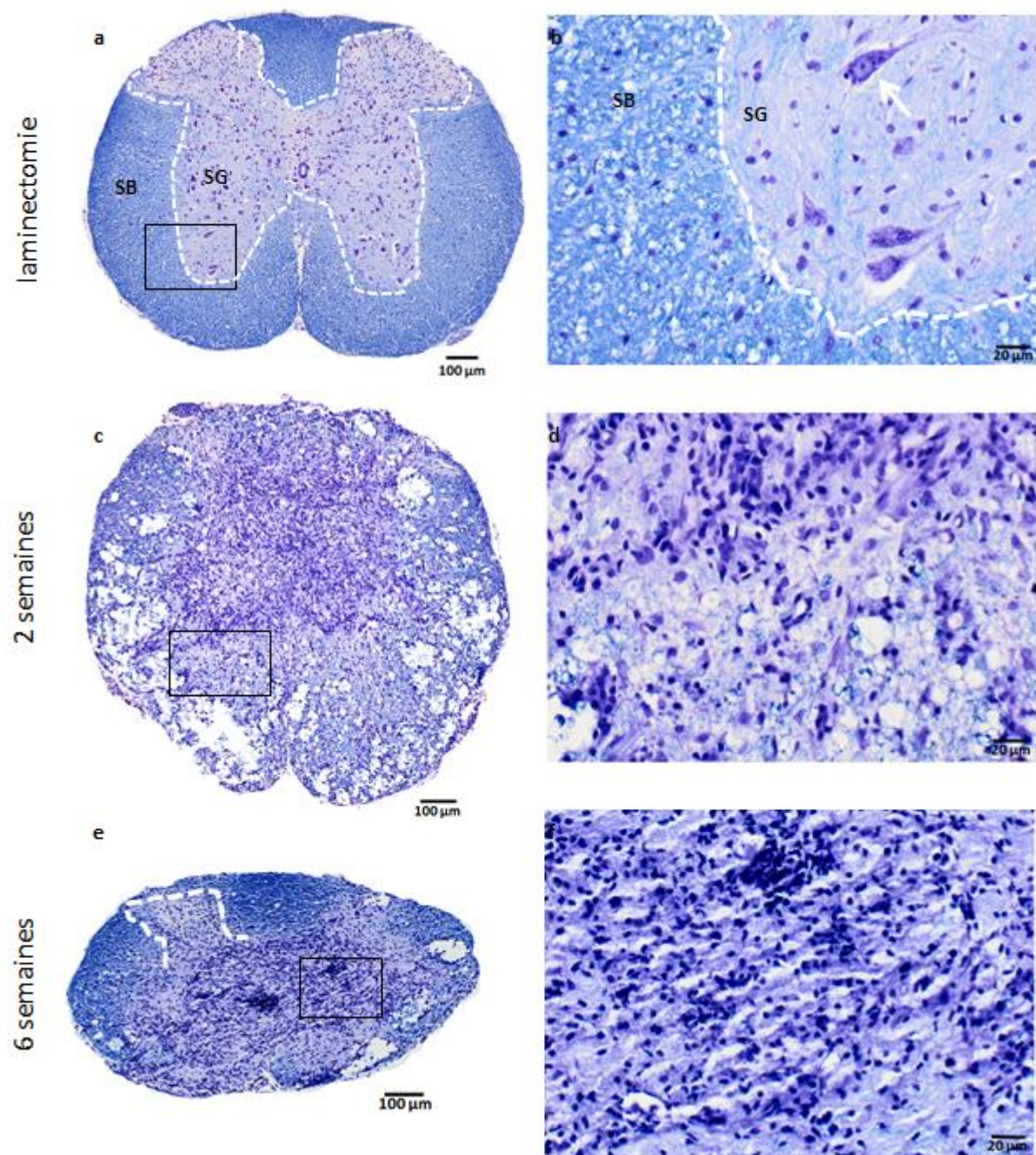
Le dénombrement des corps cellulaires des motoneurones dans la zone de la lésion de moelle montre que ces derniers vont fortement souffrir de la compression médullaire, leur nombre diminuant progressivement lorsqu'on se rapproche de l'épicentre (figure 13). Dans cette région, les corps cellulaires des motoneurones ont disparu. Cependant, aucune différence n'est visible entre les moelles 2 semaines et 6 semaines.



**Figure 13: Nombre de motoneurones présents en fonction de la distance dans la moelle de part et d'autre de l'épicentre. Résultats : moyenne, n=3 (2 semaines), n=6 (6 semaines), n=5 (laminectomies).**

Ce nombre de motoneurones a été calculé à partir des coupes de moelle colorée à l'Eriochrome C/ Crésyl violet. Ce comptage neuronal nous montre que les pertes de neurones dans la région lésée sont très importantes et tout à fait comparables entre 2 et 6 semaines post-opératoires. La région particulièrement touchée est évidemment l'épicentre, notée 0 sur l'axe d'extension rostro-caudale.





**Figure 14: Coupes de moelle épinière extraites de souris contrôle ou lésées.**

Les moelles épinières ont été extraites après perfusion de l'animal au PFA 4% et colorées à l'Eriochrome C/Crésyl violet. Les figures a et b montrent une coupe de moelle épinière provenant d'une souris contrôle (laminectomie) où on peut observer l'architecture normale du tissu, avec une substance grise (SG) et blanche (SB) bien séparées et délimitées. On peut observer la présence de motoneurones (b, voir flèche) au niveau d'une des cornes ventrales, ainsi que de nombreuses cellules gliales qui les entourent. Après induction d'une lésion (photos c à f), l'architecture tissulaire est perdue, les substances grise et blanche ne peuvent plus être distinguées, les motoneurones ont disparus de l'épicentre et sont remplacés par de très nombreuses cellules au noyau plus petit. Le tissu est également parcouru par des zones qui semblent vides, des zones laissées vacantes.

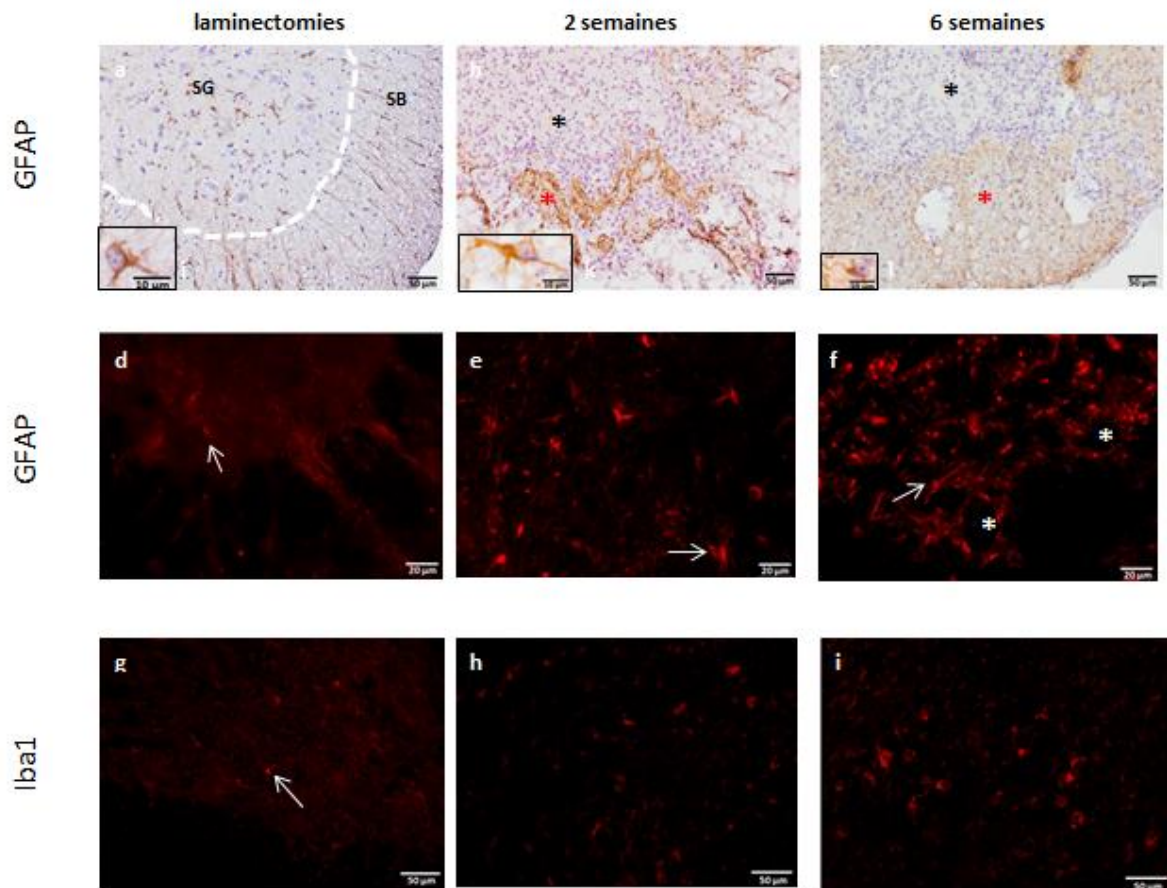
### Coloration Eriochrome C/ Crésyl violet

Cette coloration nous a permis de visualiser les modifications histopathologiques de la compression médullaire (figure 14). Lorsqu'on se situe dans des zones relativement éloignées de l'épicentre, parfois à plus de 2 mm, on trouve un tissu à l'architecture normale, comparable à ce qui est observé chez les laminectomies (figure 14a et b). On peut voir une substance grise bien délimitée, bien distincte de la substance blanche, une substance grise où l'on peut voir les péricaryons des neurones ainsi que les cellules gliales et le canal épendymaire. Dans la substance blanche, on peut voir également de nombreuses cellules gliales ainsi qu'un tissu d'aspect découpé, parcouru de multiples petites formes rondes et blanches qui parcourent la substance et qui correspondent aux zones empruntées par les fibres nerveuses transitant dans la moelle. Ces structures apparaissent blanches à cause de la myéline constituant la gaine qui entoure les fibres nerveuses mais qui est solubilisée dans les traitements aux bains d'alcools de par sa nature lipidique.

Lorsqu'on se rapproche de l'épicentre en venant par exemple du côté caudal, on constate que les conséquences de la blessure médullaire sont visibles dans des régions relativement éloignées de l'épicentre. Ces anomalies morphologiques se traduisent sous la forme de vacuolisations du tissu au sein des substances blanche et grise. Lorsqu'on se rapproche de l'épicentre, ces vacuoles de lésion deviennent non seulement plus importantes mais aussi plus nombreuses. Petit à petit, une fois que l'on se trouve dans l'épicentre et sa périphérie, la lésion change de forme (figure 14c à f). L'architecture globale du tissu normal disparaît, il est alors parfois difficile de pouvoir distinguer substance grise et substance blanche. Le tissu classique est parfois dégradé au point de laisser place à des zones vides, non-remplacées ou dans la plupart des cas, il est remplacé par un tissu fibreux et hypercellularisé : des cellules dont la nature n'a pas été identifiée. A noter que l'aspect de la lésion est identique dans les groupes de souris étudiés à 2 et 6 semaines après compression.

### **3.3) Caractérisation de la cicatrice gliale**

Nos marquages anti-GFAP nous ont permis d'investiguer l'apparition et le degré d'activation des astrocytes matures dans un contexte lésionnel en comparant cette population à celle présente dans la moelle des laminectomies (figure 15a). L'analyse des coupes montre que les astrocytes GFAP<sup>+</sup> sont présents dans la substance grise et la substance blanche, avec une répartition uniforme dans chaque partie de la moelle (figure 15a). Selon les coupes, on peut voir des zones où ils sont plus nombreux dans l'une ou l'autre substance. La forme des astrocytes semble varier selon la zone dans laquelle ils se trouvent (figure 15a). Ainsi, les astrocytes de la substance grise montrent des prolongements plus courts et ont un aspect plus dense, tandis que les astrocytes de la substance blanche semblent avoir des prolongements plus longs et effilés, correspondant à la différence morphologique attendue entre les astrocytes fibreux et protoplasmiques (voir introduction). De manière intéressante, on constate la présence de striations radiaires partant de la substance grise vers la substance blanche, positives à la GFAP (figure 15a) et également positives au marquage HA (voir chapitre marquage HA). Ces prolongements correspondent probablement aux axones des neurones dont les péricaryons se situent à proximité de la présente coupe de moelle et dont les axones quittent la substance grise pour la substance blanche où ils vont cheminer pour rejoindre leur cible. Ces derniers vont être non seulement entourés par de l'HA qui entoure les corps cellulaires ainsi que les prolongements proximaux des neurones grâce au filet périneural, mais en plus, ils sont entourés par les prolongements des astrocytes (voir introduction).



**Figure 15: Marquage de GFAP (photos a à f) (astrocytes) au DAB (a à c) et en fluorescence (d à f) et de Iba1 (photos g à i) (microglie activée).**

Chez les laminectomies, le marquage au DAB de GFAP (a) nous montre les deux populations astrocytaires réparties entre les deux substances, d'une part les astrocytes protoplasmiques de la substance grise, plus denses et plus petits et d'autre part les astrocytes fibreux de la substance blanche, plus fins mais disposant de longs prolongements. A nouveau l'architecture tissulaire est ici bien visible. Après induction de la lésion (photos b et c), on observe une répartition fortement polarisée des astrocytes qui sont totalement absents des centres des lésions (astérisques noirs) mais qui sont disposés en périphérie formant une cicatrice gliale autour de la lésion (astérisques rouges). Le centre est envahi par de nombreuses cellules non-identifiées. On assiste à une forte prolifération des astrocytes qui ne permet plus de distinguer les limites cellulaires. De plus ces derniers montrent une hypertrophie en plus de l'hyperplasie. En effet, les astrocytes présentent un aspect plus dense, ils deviennent plus grands et plus longs avec des prolongements plus développés (photos j, k, l). Ces observations sont confirmées par les images prises en fluorescence (photos d à f) où l'on observe une grande différence en termes de nombre et de morphologie entre les astrocytes provenant des lésions et de zones indemnes (flèches blanches). De nombreuses images en fluorescence nous montrent également une disposition particulière des astrocytes qui se placent en arc de cercle autour des lésions se joignant les uns aux autres afin d'entourer les zones lésées (astérisques blancs photos e et f). Il s'agit probablement d'une disposition permettant de limiter l'extension de l'inflammation dans le tissu. Concernant le marquage Iba1 (photos g, h et i), celui-ci nous indique que dans une grande majorité de cas, les microglies activés sont absents des tissus non lésés ou présents en faibles quantités, sous forme de cellules isolées (flèche blanche, photo g). Par contre, les marquages post-lésion (h et i) démontrent que ces cellules font bien partie de la cicatrisation gliale, celles-ci devenant très nombreuses, particulièrement dans l'épicentre et montrant également des adaptations morphologiques en devenant plus grosses et plus rondes.



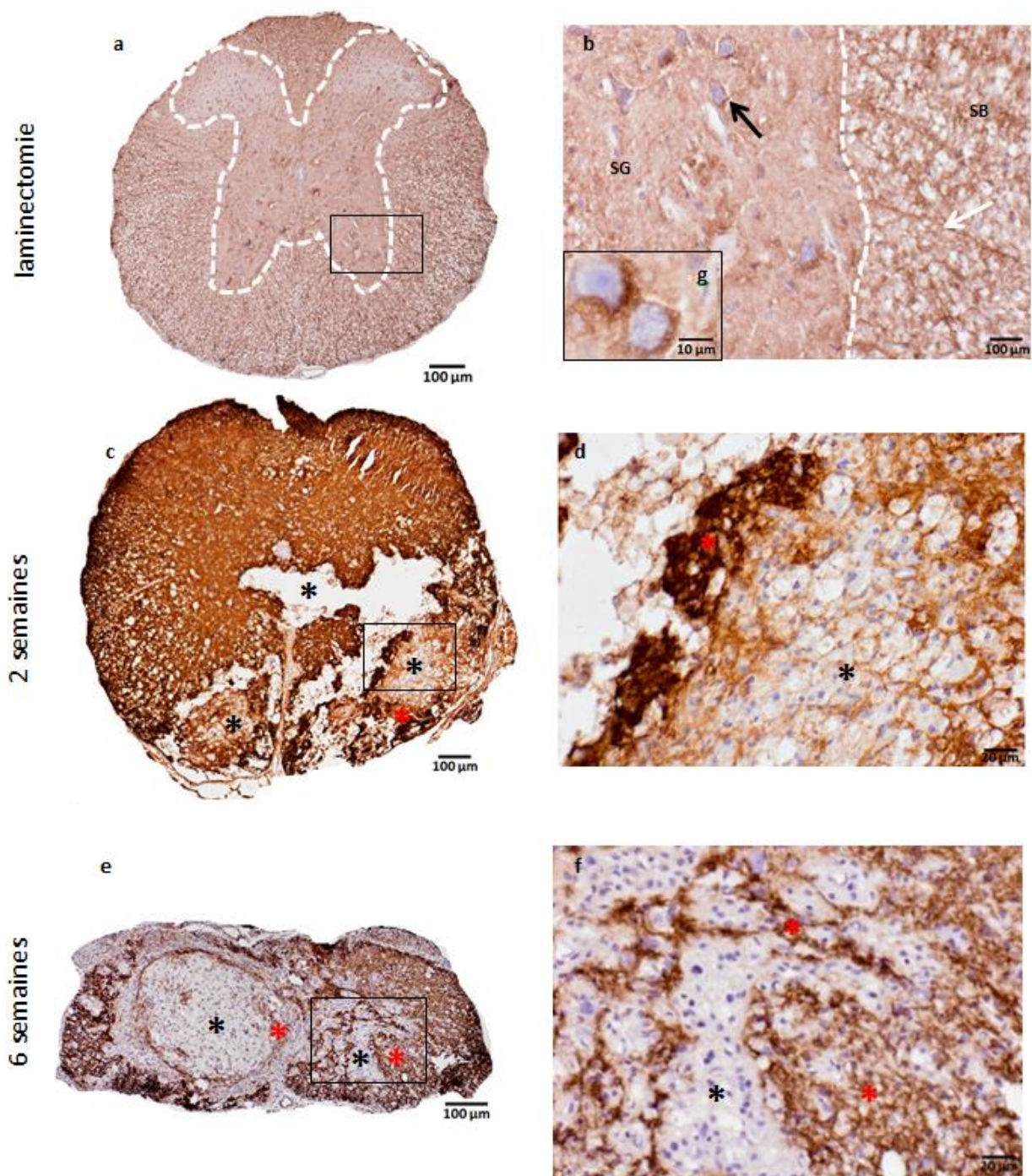
Chez les animaux lésés, ces astrocytes sont décuplés dans les zones lésées et sont les plus nombreux au niveau de l'épicentre (figures 15b et c). Les astrocytes montrent des signes d'hypertrophie, avec des corps et des prolongements plus denses, plus grands et plus marqués. Par contre, dans les zones plus lésées, ces cellules se localisent en périphérie de la zone blessée, mais ne se retrouvent jamais au centre, zone colonisée par des cellules non-identifiées. Le marquage de ces régions apparaît beaucoup plus marqué mais également plus diffus et généralisé, ne permettant plus de distinguer de véritables formes cellulaires contrairement aux coupes hors de l'épicentre des lésions ou des contrôles.

Dans le tissu normal, une grande partie des coupes traitées par fluorescence présentent un marquage positif au GFAP mais sans se généraliser (figure 15d). Les astrocytes sont pourtant présents dans la moelle en condition basale. Ceci est expliqué par la nature de la technique : la fluorescence étant une méthode peu sensible, il est plus difficile de mettre en évidence des cellules qui se trouvent peu nombreuses ou dans un état non-activé. En effet, l'augmentation du signal chez les astrocytes se trouvant proches des lésions signifierait qu'une surexpression du marqueur aurait lieu chez les cellules activées. Ceci expliquerait le peu de signal émanant de cellules plus quiescentes se trouvant dans la moelle en conditions physiologiques. Le marquage immuno-histochimique étant plus sensible, il nous a permis de mettre mieux en évidence cette population dans les moelles normales. De plus, ajoutons que GFAP est connu pour ne pas marquer tous les astrocytes. Cependant, comme dit précédemment, une grande partie des coupes montraient une population astrocytaire GFAP<sup>+</sup> présente avec des variations morphologiques entre astrocytes fibreux et protoplasmiques des substances blanche et grise parfaitement visibles.

Le marquage des moelles à 2 et 6 semaines post-opératoires nous montre une riche population astrocytaire chez les moelles lésées, sans différence particulière entre les deux timings (figures 15e et f). Lorsqu'on se rapproche de la lésion, les astrocytes apparaissent de plus en plus nombreux, leur nombre grandissant particulièrement dans la substance grise. On peut également observer des zones lésées où le tissu médullaire est fortement dégradé et autour desquelles les astrocytes se déploient, s'étendant vers leurs homologues voisins et ceinturant ainsi la zone dégradée (figure 15f, astérisque blanc). Il s'agit probablement d'une réaction de défense permettant de limiter l'expansion de la zone dégradée et inflammatoire et ainsi de protéger le tissu au maximum, grâce à la formation d'une cicatrice gliale. Au niveau de l'épicentre, de grandes étendues tissulaires sont dégradées et le tissu a perdu sa morphologie. Cette zone est alors envahie par une population cellulaire ultra-proliférative mais qui est restée non-identifiée (figure 17f, astérisque blanc). C'est ainsi que dans l'épicentre, les astrocytes sont absents de cette zone centrale de la lésion. Ils vont plutôt proliférer autour de ces grandes zones de dégradation, nous donnant un marquage très intense, très étendu et assez global, ne permettant plus de distinguer correctement les différentes cellules et leurs formes de manière évidente.

Une deuxième population cellulaire que nous avons étudiée est la microglie activée, cellules immunitaires du SNC (voire introduction) (figures 15g à i). Pour cela, nous avons utilisé un anticorps anti-Iba1, Iba1 étant un marqueur de la microglie activée. Chez les animaux contrôles, ces cellules sont présentes en faibles quantités sous forme de petites cellules isolées, principalement dans la substance grise. Il est logique que les cellules de défense du SNC soient quiescentes dans un tissu intact. Par contre, ces cellules se retrouvaient dans presque toutes les coupes provenant des animaux lésés, très souvent en quantités abondantes, de nouveau principalement dans la substance grise. De temps en temps, ces cellules semblent rassemblées dans des zones particulières, typiquement les cornes ventrales. De manière semblable aux astrocytes, ces cellules montrent une localisation péri-lésionnelle au niveau des zones fortement lésées.





**Figure 16: Marquage de l'HA au DAB dans les coupes de moelle contrôles et 2 ou 6 semaines post-opératoires.**

On peut voir dans la coupe issue de la laminectomie (photos a, b et g) la répartition physiologique de l'HA dans la moelle épinière. Celui-ci montre une répartition relativement homogène dans la substance grise (SG) excepté une zone qui semble moins concentrée dans les cornes dorsales et une zone plus concentrée autour des corps cellulaires des neurones correspondant au filet périneural (flèche noire photo b et photo g). L'HA semble par contre plus concentré dans la substance blanche (SB) où il est disposé entre les fibres nerveuses descendantes et ascendantes qui apparaissent blanches après la disparition de la myéline, mais aussi sous forme de stries radiales émanant de la substance grise et infiltrant la substance blanche (flèche blanche photo b). Ces structures correspondent probablement, comme déjà explicité, à des axones proximaux quittant la substance grise à ce niveau précis. Les coupes issues des lésions nous montrent une réorganisation de la distribution de l'HA après une blessure du tissu. Celui-ci est quasi totalement absent des centres de lésions (astérisques noirs, photos c, d, e et f) mais semble s'accumuler autour des lésions formant une sorte de coque (astérisques rouges, photos c, d, e et f) et participant probablement ainsi à la cicatrisation du tissu.

Dans les moelles prélevées à 6 semaines post-opératoires, on peut constater un même résultat chez les laminectomies que ceux observés dans le groupe 2 semaines. Ainsi, la plupart des coupes contrôles sont dépourvues de marquage Iba 1 positif. Par contre, dans les moelles lésées, cette population tissulaire se retrouve en grandes quantités à l'approche de l'épicentre et dans cette zone proprement dite, montrant même des cellules hypertrophiques, très rondes, à l'aspect gonflé. De manière similaire aux astrocytes, ces cellules ne se retrouvent pas au cœur des lésions mais plutôt en périphérie.

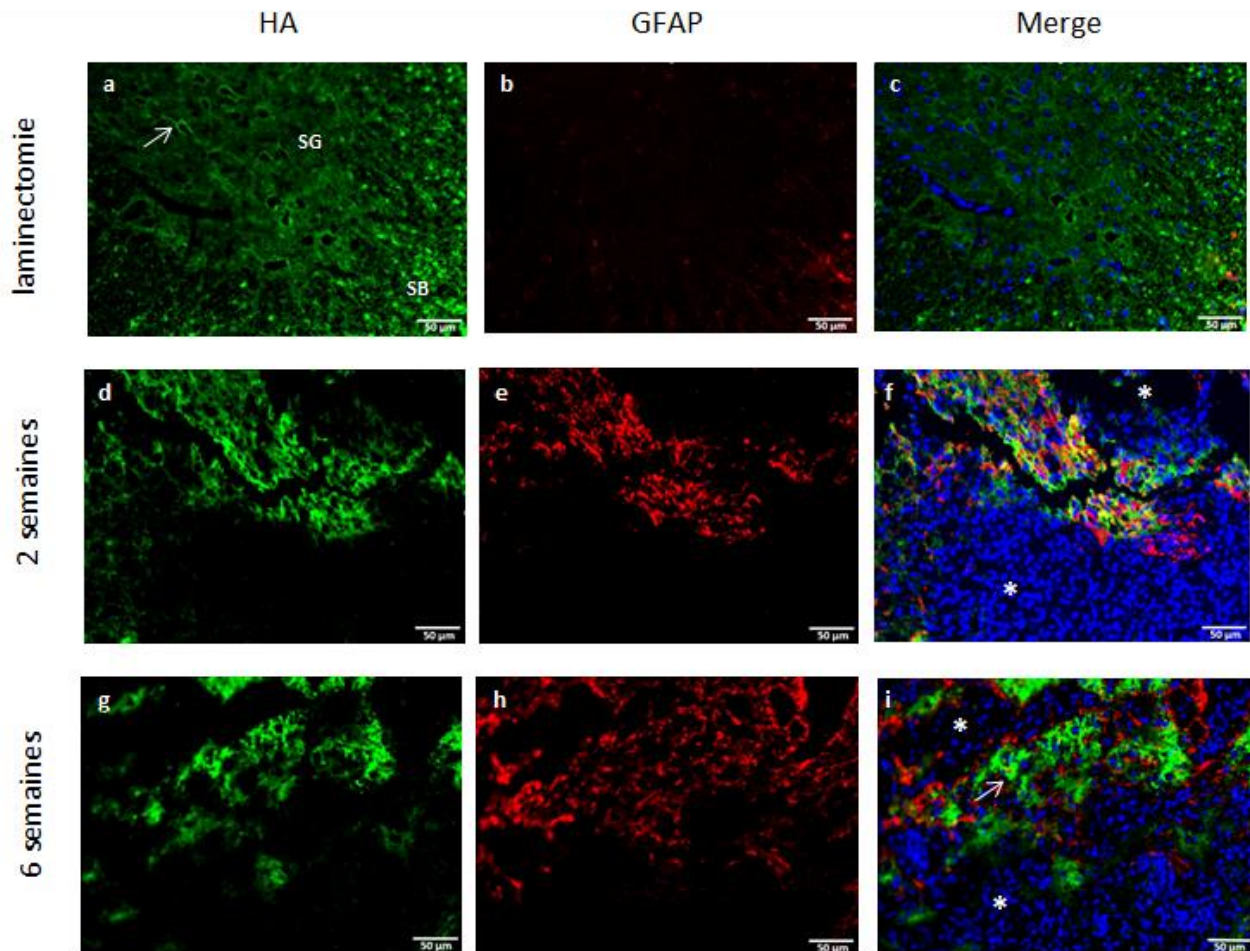
### **3.4) Distribution tissulaire de l'HA au sein de la moelle épinière**

Le marquage de l'HA au DAB-peroxydase nous a permis de confirmer sa présence dans le SNC normal et pathologique (figure 16). Celui-ci est présent dans la MEC du SNC, aussi bien dans la substance blanche où il est plus homogène que dans la substance grise mais semblait néanmoins plus abondant dans cette dernière. On y remarque une concentration particulière autour des corps cellulaires des neurones où il entre dans la composition du filet périneural (figures 16a et b). Dans la substance blanche, il se retrouve dans les espaces interstitiels entre les fibres nerveuses descendantes et ascendantes ainsi que le long de striations radiaires traversant le tissu longitudinalement depuis la substance grise vers la substance blanche (voir explication dans la section précédente). Dans beaucoup de coupes, on peut également constater une répartition assez étrange de l'HA au niveau de la substance grise, en effet, les cornes ventrales apparaissent très souvent moins marquées que la zone plus ventrale.

Lorsqu'on observe cet HA dans les moelles lésées 2 semaines après la compression (figures 16c et d), celui-ci est toujours présent bien que sa répartition intraspinale semblait perturbée. Au cœur des lésions, cet HA semble avoir en grande partie disparu faisant apparaître des zones de tissu laissées vacantes. D'autre part, en péri-lésionnel, il semble que l'HA s'y accumule, formant une sorte de coque entourant la lésion. Par contre lorsqu'on s'éloigne petit à petit de l'épicentre, on retrouve un tissu d'architecture normal où l'HA montre une répartition tout à fait comparable à celle occupée dans les tissus issus des laminectomies.

Lors de l'analyse des coupes de moelle prélevées à 6 semaines (figures 16e et f), on constate que l'HA garde une répartition comparable à ce qui est observé dans le groupe 2 semaines. Hors de l'épicentre, sa présence est similaire à ce qui est observé sur les coupes contrôles. En revanche lorsqu'on arrive dans les zones les plus lésées, on peut voir que cet HA disparaît des zones blessées où le tissu est envahi par des cellules très prolifératives et son architecture fortement perturbée. Dans certains cas, on peut néanmoins toujours observer de fines travées d'HA discrètes, qui donnent au tissu un aspect alvéolé. Par contre, autour de la blessure, l'HA apparaît beaucoup plus marqué et entoure ces zones dégradées. Il semble que cet HA soit donc synthétisé en périphérie de ces lésions et forme une sorte de coque délimitant les lésions, entrant peut-être dans la formation de la cicatrice gliale.

Le marquage fluorescent de l'HA montre une image tout à fait semblable (figure 17). Avec une présence bien marquée dans le tissu contrôle et le tissu sain des individus lésés, donc en dehors des lésions (figures 17a à c). Dans les zones lésées hors de l'épicentre, cet HA a disparu dans certaines régions relativement circulaires et restreintes. Au niveau de l'épicentre, on retrouve une lésion plus importante, avec une majorité de l'architecture tissulaire qui a disparue, laissant alors des zones détruites, dépourvues d'HA, celui-ci étant toujours présent dans la périphérie de ces zones lésées (figures 17d à i).



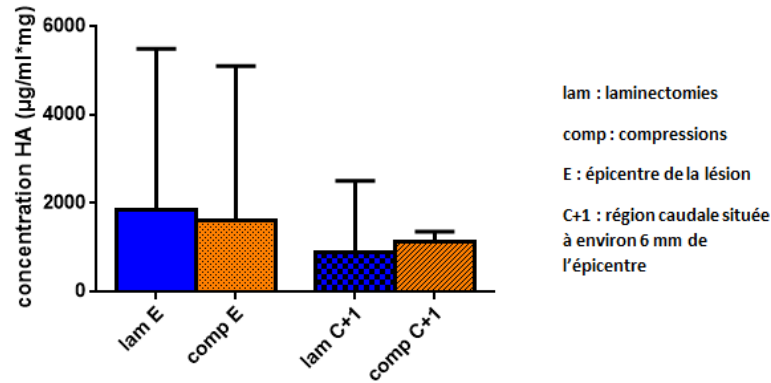
**Figure 17: Marquage fluorescent de GFAP (astrocytes, rouge), de l'HA (vert) et des noyaux (bleu, Hoechst) des coupes de moelles épinières contrôles ou 2 et 6 semaines post-opératoires.**

A nouveau, les coupes provenant des souris contrôles nous montrent la répartition physiologique de l'HA dans ce tissu, avec un filet périneural bien visible (flèche blanche, photo a). La frontière entre substance grise et blanche est bien visible, et les différentes observations faites sur les coupes marquées au DAB se confirment ici. De plus on peut observer que la population astrocytaire est relativement discrète dans un tissu sain. Après lésion (photos d à i), on peut voir la perte d'architecture tissulaire avec des zones lésées où l'HA a totalement disparu (astérisques blancs) et des zones périphériques où celui-ci est maintenu voire pourrait être accumulé. Les zones lésées sont, comme déjà précisé, envahies par de nombreuses cellules non-identifiées mais qui ne semblent pas être des astrocytes. Ces centres de lésion sont entourés par des plages denses d'HA ainsi que par de nombreux astrocytes fortement étendus. Ce qui ressort de ce marquage c'est une co-localisation partielle des astrocytes et de l'HA. Sur la coupe 2 semaines (photo f), la co-localisation semble relativement bien marquée tandis que sur la coupe 6 semaines (g, h, i), les astrocytes semblent non seulement entourer les zones lésées mais également les zones d'accumulation de l'HA (flèche blanche, photo i). Ces résultats nous poussent à émettre l'hypothèse que l'HA pourrait être fortement dégradé au centre des lésions, mais peut-être synthétisé en périphérie pour participer à l'isolation de la zone inflammatoire et entrer ainsi dans la cicatrice gliale au côté des astrocytes qui seraient, du moins en partie, à l'origine de sa sécrétion.



Dans ces zones périphériques, le marquage apparaît même plus intense, marquant probablement une accumulation d'HA autour des zones lésées, formant peut-être une coque délimitant les zones de lésions comme déjà explicité. De plus, une co-localisation partielle est observée dans ces régions en périphérie des lésions, entre l'HA et les astrocytes GFAP<sup>+</sup>. Ces pourtours de zones lésées ont tendance à contenir beaucoup d'HA ainsi que de nombreux astrocytes qui sont organisés autour des lésions. Le tissu de l'épicentre présente donc des zones dépourvues d'HA au cœur même des lésions mais aussi des zones riches en HA tout autour. On y retrouve de nombreux astrocytes ayant l'air activés, de par les changements morphologiques visibles. Cette co-localisation partielle peut prendre deux aspects différents. Dans certains cas, on retrouve vraiment une co-localisation entre astrocytes et HA autour des centres des lésions. Dans d'autres cas, on peut constater la présence de nombreux astrocytes entourant non seulement les zones lésées mais également de larges plages d'HA marquées de manière intense. Ces résultats nous portent à croire que les astrocytes seraient des cellules activement impliquées dans une sécrétion d'HA post-lésionnelle, HA qui entrerait alors dans la composition de la cicatrice gliale au côté des astrocytes.

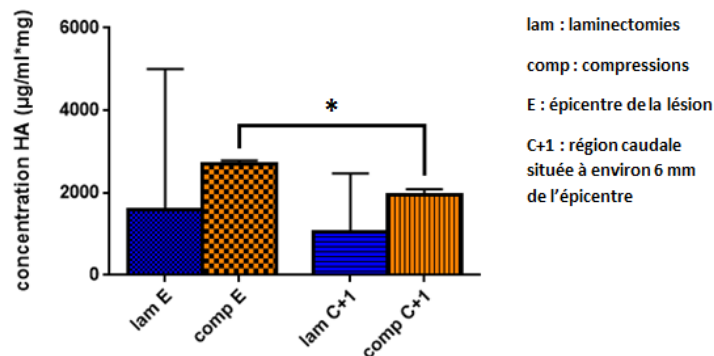
### Dosage HA, moelles prélevées à 2 semaines post-opératoires



**Figure 18: Résultats du dosage de l'HA dans les moelles des souris lésées et contrôles prélevées après 2 semaines post-opératoires. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=5.**

Des échantillons de moelle ont été prélevés chez des souris lésées et contrôles après 2 semaines post-opératoires, lyophilisés, resuspendus et dosés en terme d'HA. Malheureusement, l'analyse des résultats n'a pas permis de déceler une différence dans cette concentration, ni entre les régions des contrôles et des moelles comprimées, ni entre l'épicentre et les régions caudales des moelles lésées.

### Dosage HA, moelles lésées prélevées à 6 semaines post-opératoires



**Figure 19: Résultats du dosage de l'HA dans les moelles des souris lésées prélevées après 6 semaines post-opératoires et les moelles contrôles prélevées après 2 semaines post-opératoires. Résultats : médiane, les barres d'erreur représentent l'intervalle interquartile, n=5. Statistiques : \* : p<0.05, test de Maan-Withney.**

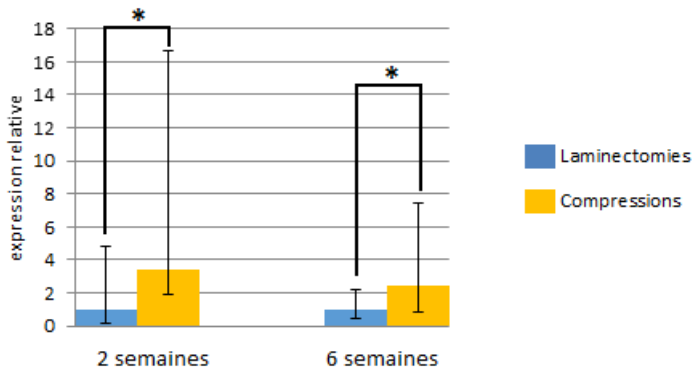
Des échantillons de moelle ont été prélevés chez des souris lésées après 6 semaines post-opératoires et chez des contrôles après 2 semaines post-opératoires, lyophilisés, resuspendus et dosés en terme d'HA. Etant donné la grande variabilité que l'on peut trouver dans les concentrations d'HA dans nos contrôles, aucune différence n'a été constatée entre moelles contrôles et lésées. Par contre, une différence significative a été mise en évidence entre l'épicentre et les régions caudales dans les moelles lésées, avec une augmentation constatée dans l'épicentre.

### **3.5) Contenu intramédullaire en HA**

La quantité d'HA présente dans les moelles lésées et contrôles a été mesurée (figures 18 et 19). Cette mesure a été réalisée d'une part dans l'épicentre de la lésion ainsi que dans une région située à 6 mm de cet épicentre, au niveau caudal. L'analyse des échantillons de moelle extraits à 2 semaines montre que l'HA est bien présent dans la moelle normale et lésée, mais de manière très variable. Ainsi elle ne permet pas de montrer une différence en terme de quantité d'HA présent entre les moelles lésées et les moelles contrôles extraites des animaux non-lésés (figure 18). Une dose semblable est détectée dans les régions homologues, cependant, une légère différence apparaît entre les régions d'épicentre et les régions plus caudales, mais celle-ci reste non-significative.

Lors de l'analyse de ce même paramètre dans les moelles lésées extraites à 6 semaines post-opératoires, les résultats montrent toujours une présence d'HA dans ces moelles (figure 19). L'hétérogénéité est bien moins importante chez ces souris lésées. En comparant la quantité d'HA dans les moelles de ces souris avec les régions correspondantes des moelles des souris contrôles du groupe 2 semaines, aucune différence significative ne peut être mise en évidence. Cependant, en comparant l'épicentre et les régions plus caudales des moelles lésées, nous constatons à nouveau une différence entre ces deux régions chez les animaux lésés et contrôles mais celle-ci est significative pour les animaux lésés, l'épicentre contenant significativement plus d'HA.

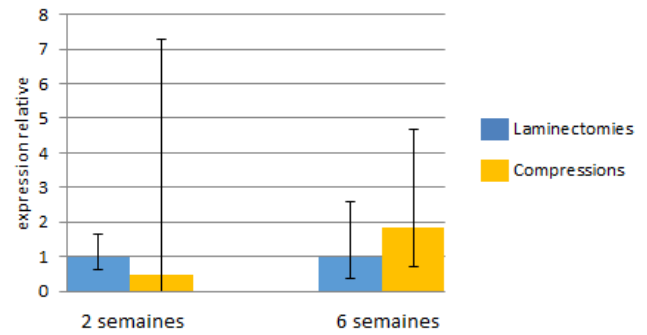
### Expression relative de HYAL1 à 2 et 6 semaines post-opératoires, région de l'épicentre



**Figure 20:** Résultats de la mesure d'expression relative du gène HYAL1 dans les moelles lésées et contrôles à 2 semaines et 6 semaines post-opératoires au niveau de l'épicentre. Résultats : quantification relative, les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%, n=3 (lam. 2 sem.), n=4 (comp. 2 sem.) et n=4 (6sem.) Statistiques : \* : p<0.05, test de Maan-Withney.

La mesure de l'expression relative de HYAL1 au niveau de l'épicentre montre une augmentation significative dans les moelles lésées à 2 semaines (3 fois supérieure) et 6 semaines (2,5 fois supérieure) post-opératoires.

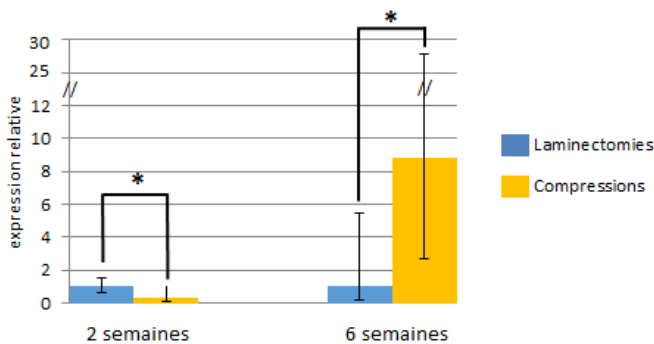
### Expression relative de HYAL2, 2 et 6 semaines post-opératoires, région de l'épicentre



**Figure 21:** Résultats de la mesure d'expression relative du gène HYAL2 dans les moelles lésées et contrôles à 2 semaines et 6 semaines post-opératoires au niveau de l'épicentre. Résultats : quantification relative, les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%, n=3 (2 sem.) et n=4 (6 sem.).

La mesure de l'expression relative de HYAL2 au niveau de l'épicentre montre que l'expression de cette enzyme semble rester stable dans les régions lésées à 2 et 6 semaines post-opératoires.

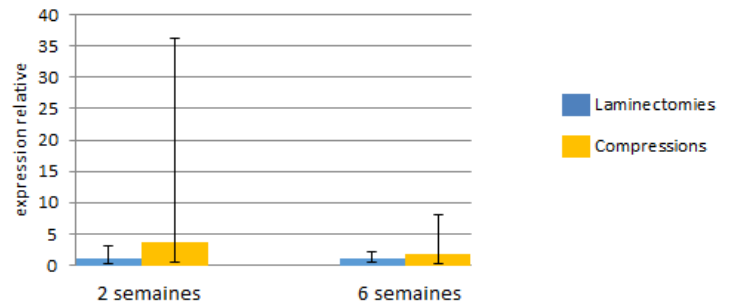
### Expression relative de HAS1, 2 et 6 semaines post-opératoires, région de l'épicentre



**Figure 22:** Résultats de la mesure d'expression relative du gène HAS1 dans les moelles lésées et contrôles à 2 semaines et 6 semaines post-opératoires au niveau de l'épicentre. Résultats : quantification relative, les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%, n=4 (2 sem.) et n=5 (6 sem.). Statistiques : \* : p<0.05, test de Maan-Withney.

La mesure de l'expression relative de HAS1 au niveau de l'épicentre montre une diminution significative de cette expression dans les moelles lésées à 2 semaines post-opératoires (3,5 fois inférieure) mais une augmentation à 6 semaines post-opératoires (9 fois supérieure) par rapport aux laminectomies correspondantes.

### Expression relative de HAS3, 2 et 6 semaines post-opératoires, région de l'épicentre



**Figure 23:** Résultats de la mesure d'expression relative du gène HAS3 dans les moelles lésées et contrôles à 2 semaines et 6 semaines post-opératoires au niveau de l'épicentre. Résultats : quantification relative, les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%, n=4 (lam. 2 sem.), n=3 (comp. 2 sem.) et n=5 (6 sem.).

La mesure de l'expression relative de HAS3 au niveau de l'épicentre n'a pas pu démontrer de différence significative d'expression de cette enzyme dans les régions lésées à 2 et 6 semaines post-opératoires.

### **3.6) Profil d'expression des HA synthases et hyaluronidases**

Les profils d'expression des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'HA ont été comparés entre les moelles des souris lésées et contrôles, sous forme d'expression relative où les mesures des échantillons provenant des laminectomies servaient de références (figures 20 à 23).

L'expression des gènes HYAL1, HYAL2, HAS1, HAS3 a été étudiée, en effet nous avons été confrontés à la difficulté de trouver une paire de primers efficace pour amplifier HAS2.

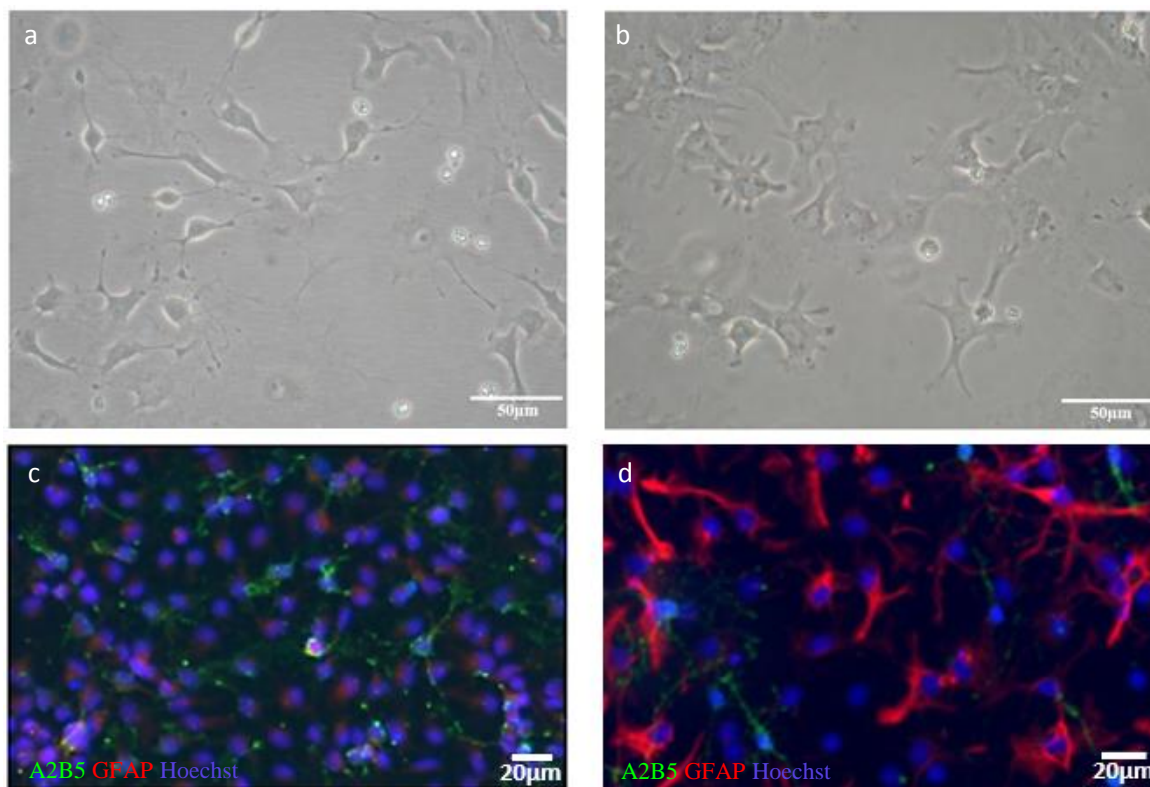
Concernant l'évaluation de l'expression génique à 2 semaines post-opératoires, l'analyse de l'expression de HYAL 1 met en évidence une augmentation significative de l'expression de l'enzyme dans l'épicentre et la région caudale proche (2mm de l'épicentre, données non-présentées) respectivement d'un facteur 3,4 et 2,1 (figure 20). L'analyse montre également que l'enzyme HYAL 2 ne subit pas de modification d'expression après la lésion du tissu médullaire (figure 21). Concernant l'enzyme HAS 1, les résultats montrent une diminution d'expression significative dans l'épicentre ainsi que dans les régions plus caudales (données non présentées), respectivement d'un facteur 3,5 et 15 (figure 22). Aucune différence significative ne peut être mise en évidence chez HAS3, cependant celle-ci montre malgré tout une augmentation d'expression d'un facteur 3,7 au niveau de l'épicentre des moelles lésées (figure 23). Il serait donc possible qu'en augmentant le nombre d'animaux étudiés, cette différence puisse se confirmer, et de manière significative cette fois. Deux semaines post-opératoires, nous assistons donc à une augmentation d'expression génique d'une enzyme dégradant l'HA et à l'inverse, une diminution de l'expression génique d'une enzyme le synthétisant.

Les mêmes gènes ont été ensuite investigués chez les moelles extraites 6 semaines après la compression médullaire.

Une partie de la tendance observée après 2 semaines post-opératoires est toujours présente dans l'analyse du second timing (figures 20 à 23). En effet, l'expression de HYAL1 est toujours augmentée au niveau de l'épicentre et l'étude de HYAL2 montre toujours un profil stable entre les tissus contrôles et lésés (figures 20 et 21). Par contre la tendance de HAS1 semble être inversée, avec une augmentation d'expression de l'enzyme dans l'épicentre des moelles lésées par rapport aux contrôles d'un facteur 8,8 (figure 22). L'expression de HAS3 quant à elle suit un profil semblable dans les moelles lésées et contrôles (figure 23), excepté dans les régions caudales à 6mm de l'épicentre où l'expression de l'enzyme est diminuée d'un facteur 3,6 (données non-présentées).

Une fois que les profils d'expression ont été étudiés individuellement pour chaque timing de prélèvement, ils ont été comparés entre eux pour éventuellement déceler des variations d'expression enzymatique entre ces deux timings mais la plupart n'ont fait apparaître aucun résultat significatif excepté la comparaison des profils d'expression des HYAL qui a démontré une diminution de l'expression de HYAL1 entre 2 et 6 semaines dans l'épicentre (données non-présentées).

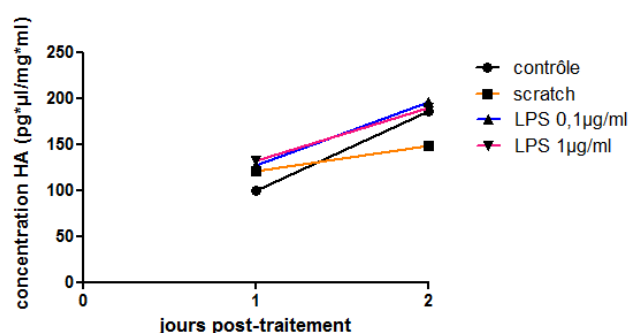




**Figure 24:** Aspect des cellules en culture et répartition des populations cellulaires avant (GRP's) et après différenciation (astrocytes) avec milieu riche en BMP4 au microscope à contraste de phase (a et b) et après un double marquage fluorescent A2B5/GFAP (c et d).

Entre les photos a et b, on peut constater l'évolution morphologique de la population cellulaire qui s'est différenciée, allant d'un stade de précurseur multipotent au stade de cellule astrocytaire bien différenciée. Les cellules GRP ont déjà une structure stellaire mais disposent de prolongements moins nombreux et beaucoup plus fins. Les astrocytes possèdent un cytoplasme plus vaste ainsi que des prolongements plus nombreux et beaucoup plus épais. La photo c nous montre le marquage sur une culture de GRP's avant la mise en contact avec le facteur de croissance BMP4. On peut voir que ces cellules disposent de prolongements cellulaires très fins et présentent également un marquage discret au GFAP. Après 7 jours de stimulation au BMP4 (d), la quantité de cellules précurseurs a fortement diminué, ne formant plus que quelques groupes isolés entre les nombreuses cellules différenciées en astrocytes A2B5/GFAP<sup>+</sup>. Ces astrocytes ont une forme stellaire beaucoup plus marquée avec un cytoplasme qui semble plus important et des prolongements plus épais.

#### Concentration en HA dans les cultures d'astrocytes après traitement



**Figure 25:** Résultats du dosage de l'HA soluble dans des cultures d'astrocytes ayant subi un scratch assay ou un traitement au LPS 0,1µg/ml ou 1µg/ml. Les puits contrôles n'ont reçu aucune stimulation. Résultats : n=1.

Les résultats indiquent qu'il y a bien une production d'HA, bien que minime, dans le milieu par les astrocytes, indépendamment des conditions. Aucune différence n'a pu être mise en évidence suivant les conditions employées. Néanmoins, une seule mesure de chaque condition a été réalisée et ceci n'était qu'une manipulation préliminaire afin de mettre en évidence la présence de l'HA ainsi que les raffinements à mettre en place pour une future manipulation proprement dite dans des travaux ultérieurs.

### 3.7) Etude de la production *in-vitro* d'HA par des astrocytes

On peut tout d'abord observer les effets de la différenciation cellulaire provoquée par l'apport de BMP4 au milieu de culture (figure 24a et b). Avant cet apport du facteur de croissance, les GRP's montrent déjà un aspect étoilé mais moins marqué, disposant de prolongements très fins et effilés, qui apparaissent moins nombreux en contraste de phase (figure 24a). Les changements morphologiques sont bien visibles après stimulation de la différenciation par le BMP4, les astrocytes ayant un cytoplasme à l'aspect plus développé, un aspect étoilé beaucoup plus marqué, disposant de prolongements plus nombreux et plus épais (figure 24b).

Dans un premier temps, un marquage A2B5/GFAP a été réalisé sur des cultures de cellules GRP mises en contact avec un milieu enrichi en BMP4 afin de les différencier en astrocytes (figure 24c et d). Avant la stimulation, on peut constater que la culture est exclusivement composée de cellules A2B5<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup>, même si un léger marquage GFAP<sup>+</sup> est visible (probablement une légère expression basale de GFAP chez les précurseurs) (figure 24 c). Ces cellules sont étoilées et possèdent des prolongements très fins. Après 7 jours de stimulation, la quantité de cellules A2B5<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> diminue et il ne reste que quelques amas de cellules précurseurs et de nombreuses cellules apparaissent A2B5<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup> (figures 24d). Ces cellules correspondent aux astrocytes et sont également des cellules étoilées mais qui possèdent des prolongements beaucoup plus épais et denses.

Ensuite, nous avons réalisé un dosage de l'HA soluble dans des puits de culture ensemencés avec des astrocytes obtenus par la différenciation des GRP's au BMP4. Cette mesure s'est faite dans des conditions contrôles, après un scratch assay et après ajout de LPS 0,1 ou 1µg/ml.

Les résultats nous montrent que de l'HA est bien sécrété par les astrocytes en culture, à faible dose (figure 25). On constate une augmentation progressive de cette concentration sur les 3 jours d'étude et ce dans les différentes conditions. En effet, sur les deux premiers jours post-stimulation, aucune différence n'a pu être décelée entre la condition contrôle et les puits stimulés. Cette manipulation n'est qu'une expérimentation préliminaire qui peut servir de base pour l'adoption de plusieurs mises au point qui permettront la réalisation de manipulations plus pertinentes ultérieurement (voir chapitre discussion).

#### **4. Conclusion, discussion et perspectives**

Nos recherches nous ont donc permis d'investiguer les conséquences histo-pathologiques d'une compression médullaire chez la souris ainsi que les répercussions sur leurs performances motrices. Nous avons pu étudier les aspects et les caractéristiques de la cicatrice gliale produite à la suite de ce trauma, la présence et la localisation de l'HA en condition physiologique et pathologique ainsi que l'évolution de sa concentration dans le tissu normal et lésé et enfin les répercussions de cette lésion sur le profil d'expression des gènes codant pour les enzymes intervenant dans son métabolisme. Finalement, des études préliminaires *in-vitro* de production d'HA par les astrocytes nous ont fourni quelques résultats préliminaires qui renforcent notre intérêt d'investiguer plus profondément l'évolution de la présence de l'HA dans le tissu médullaire traumatisé.

En regardant tout d'abord les résultats des tests physiques, force est de constater que les souris sont douées de capacités de récupération tout à fait extraordinaires. D'un point de vue morphologique, les mesures des volumes lésés ainsi que la surface de la substance blanche lésée nous montrent d'ailleurs une diminution significative des dégâts présents dans le tissu, potentiellement corrélée avec la récupération motrice partielle. Cette différence significative du pourcentage de surface lésée dans la substance blanche était significative à 450µm de l'épicentre du côté rostral. Malheureusement, le faible nombre de données n'a pas permis de réaliser des tests statistiques pour les différentes zones de la moelle concernées par cette diminution de la surface lésée. Malgré cela, les différences observées laissent penser qu'un nombre plus élevé de données nous aurait fourni des résultats significatifs. Il semble donc que l'on assiste à une rétraction de la surface endommagée. Cependant, il est également avéré que durant la phase précoce de l'évolution de la lésion médullaire, un œdème se crée suite à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (35, 36). Il est donc possible que la diminution du volume de lésion soit également due en partie à une résorption de cet œdème couplé à une fermeture de la barrière hémato-encéphalique. De plus, tous les animaux soumis quotidiennement aux tests de la BMS ont affiché au moins une récupération du mouvement des pattes après paralysie totale. Certains retrouvaient une mobilité presque totale. La paralysie observée durant les premiers jours chez les animaux lésés disparaissait au fil du temps avec un timing variable selon les individus. Néanmoins, l'analyse morphologique nous prouve que le tissu médullaire soumis à la compression est très loin d'avoir récupéré une morphologie semblable à celle d'un tissu fonctionnel. L'explication est probablement liée au fait que les fibres nerveuses, ayant subi des dégâts lors de la compression peuvent montrer une récupération. Ainsi, ils peuvent probablement repousser à travers la cicatrice formée dans la région blessée et ainsi redonner aux individus une fonctionnalité totale ou partielle des membres postérieurs. Il est également possible que certains axones démyélinisés suite à l'inflammation retrouvent leur gaine de myéline. Il est par contre clair que les régions de l'épicentre montrent un tissu en cicatrisation où la substance grise est caractérisée par une absence de corps cellulaires neuronaux. Il est donc plus que probable que certaines fonctions aient été perdues de manière définitive, celles régies par les neurones dont les corps cellulaires se trouvaient dans cette région. Ces fonctions n'ont malheureusement pas pu être déterminées faute de temps. Il est possible qu'en visant une autre région médullaire, contenant les corps cellulaires des neurones moteurs régissant les mouvements des membres postérieurs, ces souris n'auraient peut-être pas retrouvé une fonctionnalité de ces derniers.

Les résultats des tests physiques nous ont démontré l'intérêt qu'il y avait dans l'étude de la cicatrice gliale chez ces animaux. Celle-ci doit en effet probablement offrir des conditions favorables à la repousse axonale pour observer une telle récupération des capacités physiques

générales. On s'attend à ce qu'elles soient évidemment différentes de ce qui est observé chez l'humain étant donné le peu de récupération constatée après lésion du SNC chez ce dernier.

Comme explicité dans la partie « Résultats », la mesure de la BMS nous démontre que la récupération de la fonctionnalité des membres postérieurs est rarement totale après lésion de la moelle épinière.

Ce qui est très intéressant, c'est que cette BMS est corrélée aux résultats morphologiques. En effet, quand on associait les résultats finaux des BMS avec les valeurs de pourcentage de lésion totale de la moelle épinière (figure 4), les valeurs de pourcentage de lésion dans les substances blanche et grise ainsi que le volume de lésion dans les épïcètres, on pouvait constater une corrélation entre les facteurs. C'est ainsi que les deux souris ayant les scores de BMS les plus élevés au 42<sup>ème</sup> jour post-opératoire (8 et 9) montraient des pourcentages et les volumes de lésions moindres que ceux observés chez les souris ayant de faibles scores finaux de BMS (3 ou 4).

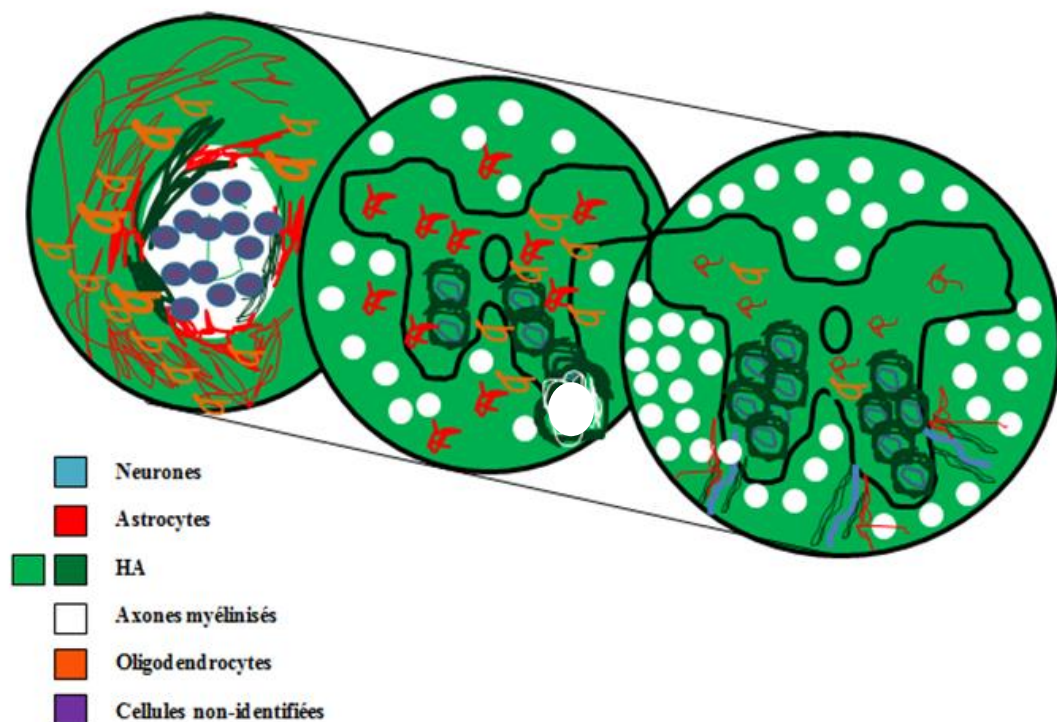
Il est donc clair que la proportion de dégâts engendrés dans la moelle épinière conditionne la récupération des capacités physiques des animaux traumatisés. Dès lors, jouer sur la préservation du tissu médullaire et sur la qualité de la cicatrice gliale qui peut cloisonner la zone lésée et limiter éventuellement son expansion permettraient de favoriser le retour des capacités physiques d'un individu blessé.

Si on s'intéresse à la force motrice qui peut être développée par ces animaux, on remarque que celle-ci est en partie récupérée. Les résultats de Grip strength nous montrent que l'opération en elle-même perturbe les capacités physiques des animaux. Les laminectomies montraient également une diminution de la force de traction. Ceci est probablement dû aux dégâts provoqués lors de la section des muscles dorsaux. Les résultats obtenus chez les animaux lésés nous montrent qu'ils récupèrent en moyenne 56,25% de leur force de traction. Le test du Hanging wire est quant à lui bien moins informatif car les animaux lésés se contentent d'utiliser leurs membres antérieurs pour se suspendre en attendant de récupérer la mobilité des postérieurs, leurs membres antérieurs étant tout à fait capables de supporter l'animal. De manière similaire au Grip strength, le Rotarod montre que les capacités motrices des animaux lésés ne peuvent être récupérées totalement, en particulier la coordination.

En conclusion, les souris retrouvent une mobilité des membres postérieurs en 3 à 11 jours et cette facilité de mobilité va augmenter dans les semaines à venir avec une vitesse et un résultat final fortement variable selon les individus. Au-delà de la simple mobilité, les animaux vont également récupérer une partie de leur force musculaire mais celle-ci ne sera pas totale, la coordination étant fortement perturbée. Globalement, les performances motrices seront corrélées au volume encore occupé par la lésion médullaire, qui est probablement dépendant du cloisonnement généré au moment de la cicatrice gliale.

L'étude de la cicatrice et de la répartition de l'HA au sein des tissus normaux et lésés nous montre une forte perturbation du tissu médullaire, résultante probable d'un mélange de destruction tissulaire et de réponses du tissu au traumatisme infligé.

Une réponse claire nous est démontrée par nos divers marquages de GFAP et Iba1. En effet, la population astrocytaire GFAP<sup>+</sup> est fortement multipliée au niveau des zones lésées où l'on constate une hyperplasie et une hypertrophie des cellules. Les zones lésées affichent un marquage beaucoup plus étendu où les limites cellulaires deviennent difficiles à distinguer. Les cellules vont en plus adopter une organisation particulière, s'organisant autour des zones détruites probablement dans le but de les isoler. A cette réaction s'ajoute également la multiplication des cellules microgliales qui révèlent également une hypertrophie.



**Image 14 :** Représentation schématique de l'organisation du tissu médullaire depuis les zones indemnes jusqu'à l'épicentre de la lésion.

La tranche à l'extrême droite représente le tissu en conditions normales où l'on peut voir l'HA présent dans les substances grise et blanche. Dans cette dernière il se retrouve entre les fibres nerveuses myélinisées. L'HA apparaît plus concentré dans le filet périneural et le long des axones quittant la substance grise, également en contact avec des prolongements astrocytaires. Peu de microglyocytes activés sont présents et ils apparaissent sous forme de petites cellules discrètes. Les astrocytes sont présents dans les deux substances avec des phénotypes différents. Lorsqu'on se rapproche de l'épicentre, certaines zones sont lésées et l'architecture tissulaire ainsi que l'HA sont perdus localement. Les cellules gliales commencent à devenir plus concentrées et phénotypiquement adaptées aux conditions. Dans l'épicentre (coupe de gauche), l'architecture tissulaire est perdue sur une grande partie de la surface de la moelle, de grandes zones sont dégradées et l'HA y disparaît tandis que des cellules prolifératives non-identifiées colonisent cette zone lésée. Les astrocytes sont alors très nombreux et montrent des modifications morphologiques, de telle sorte qu'ils apparaissent plus gros avec des prolongements plus épais et développés. Il devient même parfois difficile de distinguer les limites cellulaires. Ces astrocytes peuvent s'organiser en périphéries des lésions, zones périphériques où l'HA semble être accumulé formant une coque. Les microgliocytes sont également beaucoup plus nombreux et développés, et tout comme les astrocytes, ceux-ci se retrouvent autour des centres de lésions mais pas en leur sein.

Comme pour les cellules précédentes, les cellules microgliales n'infiltrant pas les lésions mais se placent plutôt en périphérie de l'épicentre. (image 14)

On peut observer comme explicité précédemment que l'HA subit une redistribution évidente au niveau du tissu lésé. En effet, on constate que les zones fortement lésées de l'épicentre montrent une disparition quasi-totale de l'HA dans la blessure et même de la MEC en générale. Une forte prolifération cellulaire qui malheureusement n'a pas pu être identifiée, est également présente. Par contre, l'HA semble être accumulé en périphérie de la blessure, entourant ces zones et formant une sorte de coque. Il est donc probable qu'une MEC dense contenant de l'HA soit apposée autour de la blessure pour créer une sorte de frontière entre tissu lésé et intact, un possible moyen de limiter l'influence de la zone lésée et donc perturbée sur les zones encore physiologiquement stables ou presque. Cette sécrétion est peut-être une production des astrocytes qui, comme explicité précédemment, affichent également une tendance à augmenter en périphérie de la blessure et montrent une co-localisation partielle avec l'HA. Cette prolifération s'accompagne également de changements morphologiques, signe probable d'une adaptation à la situation, qui serait peut-être accompagnée d'une reconversion métabolique.

Le tissu de l'épicentre est donc composé de deux types de zones, certaines zones fortement lésées, au cœur des lésions, où l'HA est totalement absent mais où des cellules non-identifiées prolifèrent en très grandes quantités. Autour, le tissu montre une certaine concentration d'HA avec notamment des zones très riches où l'HA semble être accumulé, particulièrement autour des lésions.

Bien que le marquage de l'HA ne constitue pas une méthode quantitative (mais qualitative, voire semi-quantitative tout au plus) ce qui est assez paradoxal à première vue, c'est d'observer une telle variation de l'HA dans le marquage sans observer de différence significative dans son dosage. Malgré tout, rappelons qu'une différence significative a été observée entre les épicentres et les régions plus caudales chez les animaux lésés conservés 6 semaines. Lors de cette manipulation, il a été nécessaire de comparer les tissus lésés prélevés à 6 semaines avec les tissus contrôles prélevés à 2 semaines, ceci à cause de la panne des lyophilisateurs présents dans les laboratoires, empêchant le processing des échantillons laminectomies 6 semaines. Or, les échantillons contrôles prélevés à 2 semaines montraient une grande hétérogénéité au niveau de la quantité d'HA. Il est possible que ce facteur nous ait empêché de démontrer une différence significative entre le tissu lésé prélevé à 6 semaines et les tissus contrôles.

En effet, une curieuse différence, bien que non-significative, était visible entre l'épicentre et la région caudale chez les contrôles. Cet effet pourrait être dû à l'influence de l'inflammation causée par l'opération sur la synthèse d'HA dans la moelle épinière, mais inférieure à celle causée par l'induction de la lésion, expliquant ainsi la différence significative observée chez les lésées 6 semaines et celle non significative chez les laminectomies. Pourquoi ce n'est pas le cas chez les souris lésées sacrifiées à deux semaines ? Une des explications serait que l'échantillon était trop petit pour montrer cet effet et que la variabilité qui régit la quantité d'HA étudiée ait fortement influencé les résultats. Une autre possibilité serait une différence de production d'HA entre les périodes 2 semaines et 6 semaines post-opératoires. Enfin, une autre hypothèse serait qu'il n'y a tout simplement pas de différence significative en terme de quantité d'HA entre les lésions et les régions indemnes et que l'effet significatif démontré chez les souris 6 semaines soit dû au hasard (nous sommes certains de notre résultat à 95%, il reste 5% d'erreur probable : erreur de type alpha). Il faut de toute manière garder à l'esprit qu'il est très difficile de tirer des conclusions à partir de ces résultats étant donné l'énorme variabilité rencontrée dans la concentration en HA des tissus contrôles prélevés à 2 semaines.

Par contre, la faible variabilité au sein des échantillons lésés 6 semaines rend leur analyse beaucoup plus pertinente.

Ce que l'on constate, c'est que l'HA est redistribué au sein de l'épicentre: quasiment absent dans la blessure mais fortement concentré en périphérie. On pourrait donc assister à une résultante nulle avec des augmentations et diminutions respectivement dans la périphérie et dans le centre de la lésion qui se compenseraient et déboucheraient sur un dosage ne montrant aucune différence absolue de concentration en HA. Enfin, une dernière hypothèse serait que l'absence d'effet démontré soit due à une mauvaise décision de notre part. Effectivement, nous avons choisi de prélever des échantillons de moelle de 4mm de longueur pour chaque condition. Au regard de la taille des lésions analysées et particulièrement de la taille des épicentres, il se pourrait que cette gamme de tailles soit beaucoup trop élevée pour pouvoir démontrer un effet de la lésion sur la quantité d'achat produite. La variation de cette quantité pourrait être apparue sur une région relativement restreinte et pourrait avoir été noyée, dissimulée par la taille de l'échantillon prélevé qui contiendrait une forte proportion de tissu non lésé. Ce qui est certain c'est que cette quantité d'HA est soumise à une énorme variabilité interindividuelle, rendant difficile cette analyse.

L'analyse intégrée des résultats des PCR's quantitatives nous montre que le profil d'expression enzymatique des HAS et des HYAL étudiées est partiellement modifié. En effet, l'expression de HYAL2 ne semble pas fluctuer après une lésion médullaire et que HAS3 montre une modification très timide et non-significative. Cependant, de plus amples investigations seraient nécessaires. En effet, HAS1 ayant son expression génique diminuée à 2 semaines post-traumatisme, il se pourrait que le niveau d'expression de HAS3 augmente pour agir comme enzyme suppléante. Il est donc possible que si l'on recommence l'expérience avec plus d'animaux, cette hypothèse puisse se confirmer avec une augmentation significative de l'expression de HAS3. Les tendances observées à 2 semaines post-opératoires pour HYAL1 et HAS1 semblent par contre mettre en évidence une reconversion du métabolisme de l'HA, avec une enzyme HYAL1 montrant une augmentation significative de son expression et une enzyme HAS1 suivant une tendance inverse de façon significative. On aurait donc affaire à une situation où l'HA serait plus dégradé que synthétisé. Cependant, cette hypothèse doit être considérée avec beaucoup de prudence car d'une part l'augmentation du nombre de copies d'ARNm ne signifie pas toujours augmentation d'activité enzymatique et d'autre part, les résultats de dosage de l'HA n'ont pas pu confirmer cette tendance. Comme précisé dans l'analyse du dosage, il serait intéressant de recommencer les manipulations en travaillant avec des échantillons de taille moindre car dans ce cas, la détection de l'HA deviendrait probablement plus sensible à de potentielles variations. Pourquoi alors les résultats sont-ils bien mis en évidence pour l'expression génique? L'explication pourrait être la faible production de ces enzymes à la base, en conditions physiologiques dans le tissu médullaire. La détection de variation de leur expression pourrait alors être très sensible aux variations, particulièrement en cas d'augmentation d'expression mais ceci n'est évidemment qu'une hypothèse.

Après 6 semaines, la tendance évolutive observée dans l'expression de HYAL1 après 2 semaines était confirmée. La comparaison entre les résultats 2 semaines et 6 semaines post-opératoires montrent par contre une légère diminution significative de son expression, démontrant peut-être l'amorçage d'un retour à la normale progressif qui se poursuivrait les semaines suivantes. HAS1 quant à elle, montre un profil d'expression inversé, avec une augmentation d'expression à 6 semaines post-opératoires dans l'épicentre. Il y aurait peut-être un lien entre cette modification et les résultats de dosage à 6 semaines post-opératoire qui ont démontré une quantité significativement plus importante d'HA dans l'épicentre des moelles lésées par rapport aux régions caudales éloignées.

Il pourrait donc s'agir d'une démonstration d'une nouvelle synthèse d'HA amorcée après une dégradation forte qui avait eu lieu dans l'épicentre, ce qui est aisément visible dans les coupes de moelles réalisées à 2 et 6 semaines post-opératoires.

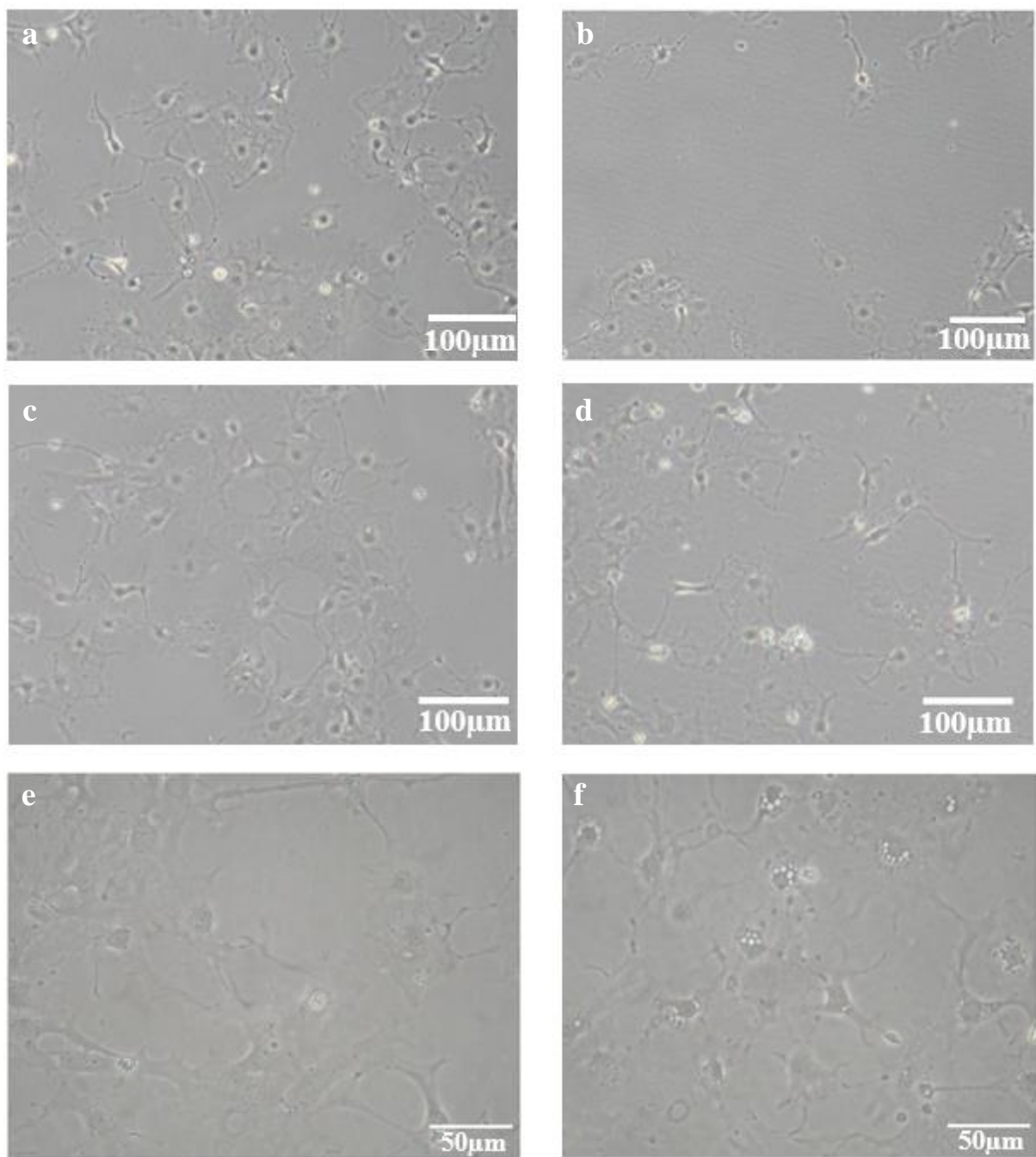
Ajoutons que l'absence de modification du profil d'expression génique de certaines enzymes comme HYAL2 ne veut pas forcément dire que celles-ci ne sont pas régulées différemment après un trauma médullaire. Il est connu que la modulation du turnover catabolique et des activités des HYAL fournissent des mécanismes de réponses rapides pour changer les niveaux d'HA plutôt que des réactions synthétiques (22). De cette manière, le taux d'ARNm produits pourrait varier très faiblement, mais la régulation aurait lieu plus en aval, en agissant sur l'activité des enzymes et non sur leur quantité.

Il est malgré tout possible que l'absence de modification du profil de leur expression soit due à nos conditions expérimentales et aux enzymes elles-mêmes. Ainsi, à nouveau de façon similaire au dosage, le fait de prélever des échantillons de 4mm de longueur pourrait dissimuler des modifications d'expressions subtiles présentes dans des régions relativement restreintes du tissu. De nouveau la proportion de tissu « normal » dans chaque échantillon diluerait l'effet potentiel recherché. Prélever des échantillons plus restreints permettrait peut-être de mettre en évidence d'autres modifications du profil d'expression enzymatique. On sait également que les HYAL sont difficiles à purifier à partir des tissus somatiques et on n'ignore pas qu'elles sont présentes en très faibles quantités, ce qui compliqueraient donc leur détection et leur étude. D'ailleurs, les analyses d'expression de ces enzymes dans le tissu médullaire ont été relativement laborieuses.

Ajoutons qu'une fois de plus nos expérimentations souffrent du faible nombre d'animaux engagés dans les analyses. Avec 5 animaux dans chaque condition, nous réduisons fortement nos chances de démontrer un effet réel de modification, que ce soit au niveau de la quantité d'HA ou d'ARNm des enzymes qui lui sont liées. Malgré tout, ce nombre d'individus doit rester gérable, et nous devons disposer d'animaux différents pour diverses expérimentations. La charge de travail peut vite devenir lourde en comptant d'une part les opérations à réaliser, tous les soins post-opératoires à dispenser, les tests physiques journaliers et hebdomadaires à effectuer, les contrôles de l'état de bonne santé, les sacrifices, les prélèvements, les processings des échantillons et enfin les manipulations et analyses. Tout cela justifie le nombre restreint d'animaux employés.

Concernant les manipulations *in-vitro*, il faut tout d'abord préciser que ces dernières ne constituent que des manipulations préliminaires qui nous permettent de réaliser de nombreuses mises au point nécessaires pour créer un modèle pertinent de sécrétion de l'HA dans des cultures d'astrocytes. En effet, ces manipulations n'ont été réalisées qu'en un seul exemplaire. Les résultats obtenus montrent que même si cette sécrétion d'HA est très faible dans les premiers jours de culture, elle est bien présente et la concentration en HA a augmenté sur les trois jours de mesures. Ces résultats démontrent que l'HA est présent et détectable dans les milieux. Ils nous encouragent à affiner ce modèle. Etant donné la faible production d'HA et donc la difficulté de la détecter, une première optimisation sera d'ensemencer plus de cellules (60 000 cellules/cm<sup>2</sup>) et surtout de les laisser pousser jusqu'à confluence avant de traiter les puits. Il est également possible que le faible taux d'HA détecté soit dû à une faible proportion d'HA réellement soluble et donc prélevé dans les échantillons. En effet, il est possible que celui-ci soit en très grande partie rivié à la surface des cellules via ses récepteurs. Il serait également intéressant d'étudier la production d'HA durant des timings plus longs après la stimulation. En effet, nous avons mesuré la concentration en HA jusqu'au jour 4 post-traitement (données non-présentées), et c'est à partir de ce timing qu'une différence apparaissait entre conditions contrôles et traitées (scratch et traitement au LPS 1µg/ml).





**Figure 27: Photographies des cultures d'astrocytes à 2 jours post-traitement : conditions contrôles (a), après un scratch (b), après traitement au LPS 0,1µg/ml (c et e) et après traitement au LPS 1µg/ml (d et f).**

L'image a nous montre les cellules en conditions contrôles, la forme étoilée des astrocytes est bien visible. Après la réalisation d'un scratch (b), on peut voir une trace où les cellules ont été arrachées et dégradées. Après 2 jours, on peut apercevoir un timide déplacement astrocytaire pour recoloniser la zone touchée. Deux jours après la stimulation au LPS, aucune différence n'était visible entre la condition contrôle et les conditions traitées, indépendamment de la dose (c et d). Cependant, 4 jours après la stimulation au LPS 1µg/ml, les astrocytes montraient des signes de souffrance sous forme de vacuolisation (f), ce qui n'était pas observé chez les cellules traitées avec le LPS 0,1µg/ml (e).

Cependant, ces données n'ont pas été présentées car cette chute de concentration pourrait être due aux conditions induites mais pourrait également être fortement influencée par le changement de milieu réalisé au deuxième jour post-traitement.

Une des difficultés dans la mesure de cet HA soluble est donc de mesurer une dose d'HA dans des milieux qui doivent être renouvelés tous les 2 jours. Il faudrait donc trouver un moyen de remplacer un minimum de milieu pour permettre aux cellules de survivre sans éliminer une trop grande quantité d'HA produite. L'étude de timings plus longs semble être très intéressante lorsque l'on voit que les conséquences du traitement n'apparaissent qu'à partir du jour 4 post-traitement pour le puits ayant reçu une dose de LPS  $1\mu\text{g/ml}$  (figure 27). Effectivement, on peut remarquer l'aspect du puits contrôle (figure 27a), de la zone abîmée du puits ayant subi un scratch (figure 27b) ainsi que l'aspect des astrocytes traités au LPS  $0,1\mu\text{g/ml}$  et  $1\mu\text{g/ml}$  (figure 27c et d), et ce, 2 jours post-traitement. Aucune différence ne peut être observée entre les cellules traitées et les cellules de la condition contrôle. On peut simplement observer que la zone de scratch est progressivement recolonisée par des astrocytes qui semblent s'étendre et migrer pour combler la zone lésée (figure 27b). A 4 jours post-traitement, les astrocytes ayant reçu une dose de LPS  $0,1\mu\text{g/ml}$  ne révèlent toujours pas de signe particulier, par contre ceux ayant reçu une dose de  $1\mu\text{g/ml}$  montrent clairement des signes de souffrances sous forme d'une vacuolisation. Il paraît donc intéressant de mettre en place une nouvelle expérimentation où la production d'HA serait investiguée bien après le jour 4, jour de l'apparition d'une conséquence visible du traitement.

Lors de cette manipulation, il était nécessaire de trouver un moyen de normaliser la concentration en HA soluble par rapport au nombre de cellules présentes dans le puits, la concentration en HA étant probablement proportionnelle à ce nombre de cellules. C'est pourquoi un puits était utilisé pour chaque jour de mesure et conservé durant 1, 2 ou 4 jours. A la fin du temps de conservation et après récupération d'un échantillon de milieu, les cellules étaient lysées. Ce lysat était récupéré pour réaliser une extraction d'ARN et un dosage de ce dernier afin de normaliser nos résultats. Ce choix partait du postulat que la quantité d'ARN produite devait être proportionnelle au nombre de cellules présentes. Cependant, la mise en place de conditions inflammatoires via un ajout de LPS risque d'avoir fortement perturbé le profil de production d'ARN des cellules. Il est donc possible que les différentes conditions ne puissent plus être comparées entre elles malgré la normalisation, la référence étant perturbée par les conditions induites. Il serait donc plus intéressant de doser l'ADN, ou bien de réaliser une PCR quantitative d'un gène ménage à partir des extraits d'ARN pour réaliser cette normalisation.

Enfin, se contenter du dosage de l'HA semble insuffisant, cette mesure devrait être complétée par une étude du profil d'expression des HA synthases et hyaluronidases en conditions normale et stimulées.

Il est donc nécessaire de tenir compte de ces optimisations et plus encore avant de relancer cette manipulation qui pourrait alors devenir pertinente et apporter plus d'informations sur la sécrétion d'HA par les astrocytes en conditions pathologiques.

L'ensemble de nos résultats semble très encourageant et indique probablement un remaniement de l'HA et des enzymes qui lui sont liés après un trauma médullaire. A la vue de ces modifications et de la redistribution d'HA qui a lieu après le trauma, il est également possible que l'HA joue un rôle dans la formation de la cicatrice gliale, la réparation tissulaire et peut-être aussi la repousse axonale, au vu des nombreux rôles que l'HA peut détenir dans la prolifération et la migration cellulaire à travers les liens avec ses récepteurs.

Si nous jetons un coup d'œil à la littérature, peu de recherches ont examiné ce domaine mais nous pouvons néanmoins trouver quelques études qui semblent mettre en évidence des rôles potentiels de l'HA dans la réparation du SNC après une lésion. En effet, il a été montré que le HMW-HA diminuait la prolifération cellulaire et la production de CSPG dans des cultures d'astrocytes néo-nataux et adultes mais que la dégradation du HMW-HA natif induisait l'activation et la prolifération des astrocytes (9). Toujours en *in vitro*, il a été prouvé que le récepteur RHAMM était impliqué dans la médiation de la motilité et la migration des neurites (37).

Chez le rat, le modèle le plus populaire pour ces investigations, Struve *et al.* ont montré en 2005 que l'HA dans la moelle épinière était dégradé assez tôt après une blessure par compression (23). En effet, trois jours après la blessure, ils ont démontré une réduction dramatique du marquage de l'HA corrélié avec un marquage GFAP augmenté et un niveau élevé du récepteur CD44 (23). Cependant, de l'HA nouvellement synthétisé s'accumulait depuis le 5<sup>ème</sup> jour après la lésion dans la gliose, de telle sorte que le HMW-HA devenait surabondant dans la MEC entourant la cicatrice gliale après le premier mois (23).

Ils ont aussi démontré que cet HMW-HA pouvait inhiber la prolifération astrocytaire et ainsi limiter la cicatrice gliale (23). Il semble que les rôles de l'HA seraient variables selon leur poids moléculaire. Ainsi, après une blessure le HWM-HA est fragmenté en partie à cause de la libération d'enzymes comme les hyaluronidases et des MMP's (8). Le LMW-HA créé est un DAMP qui initie la signalisation inflammatoire dans les macrophages ou cellules microgliales (8).

Par contre, en 2004 après lésion du cerveau de rat, Moon *et al.* ont montré qu'une dégradation partielle de l'HA et des CSPG et une déplétion en HA lié au CSPG augmentait la repousse locale des axones du SNC coupés et la régénération sur longue distance échouait quand ces régions contenaient des résidus de ces HA-CSPG (38). Il est donc possible que l'HA, le CSPG et les deux liés interviennent dans l'échec de la régénération spontanée des axones dans le cerveau et la moelle épinière adulte mammalienne blessée (38). Concernant les enzymes liées au métabolisme de l'HA, peu de choses sont connues à propos de leur expression génique dans la moelle épinière normale ou lésée. Dans un modèle de cerveau traumatisé, il a été montré que l'expression de HAS 1, 2 et HYAL 2 augmentait significativement après lésion avec des cinétiques différentes comparées aux contrôles, suggérant une régulation et un rôle dynamique du métabolisme de l'HA dans les réponses secondaires au trauma du cerveau (39). Ces résultats semblent contradictoires avec ce que nous avons obtenu pour HYAL2. Néanmoins, il s'agit ici du cerveau et non de la moelle épinière et rien n'indique que ces deux tissus réagissent de la même manière aux traumatismes, bien que faisant partie tout deux du SNC. Chez les souris, peu de travaux ont été réalisés mais il a été montré que les HAS fournissaient un rôle physiologique dans le volume du cerveau grâce à des souris KO pour les trois HAS qui démontraient un volume cérébral réduit et des formes d'activités épileptiques (HAS3) (40).

Finalement, le rôle pro-inflammatoire du LMW-HA a été mis en évidence chez les souris aussi (41). Toutes ces découvertes semblent indiquer un rôle potentiel de l'HA dans l'évolution de la cicatrice gliale.

A long terme, ce domaine d'investigations pourrait ouvrir des portes vers de nouvelles thérapies pour les lésions de moelle épinière comme les hydrogels d'HA et injections déjà testés chez les animaux. Ainsi, il a été montré qu'un produit de dégradation oligosaccharidique de l'HA, HA4, un tétrasaccharide, peut améliorer la récupération de fonctions motrices après lésion ainsi que promouvoir la croissance axonale et limiter l'infiltration de cellules inflammatoires et la mort des neurones par excitotoxicité (42). Ces effets ont été démontrés chez les souris et les rats (42, 43). D'autres gels de HMW-HA diminuaient l'infiltration de cellules immunes, l'activation d'astrocytes et la production de CSPG dans des modèles d'hémisection de la moelle chez le rat (3). Finalement, Gupta D *et al.* ont rapporté que des gels d'HA et méthylcellulose injectés dans l'espace intrathécal, après lésion de moelle, pouvaient engendrer des bénéfices thérapeutiques en terme d'inflammation et de comportement comme mesuré par la BMS (44). Ces résultats et les effets variables de l'HA renforcent la théorie selon laquelle il y a différents rôles de l'HA en fonction de son poids moléculaire et ceci démontre le besoin d'investigations supplémentaires de l'HA et de ses enzymes dans le SNC.

Des investigations ultérieures devraient par conséquent être lancées pour confirmer ces quelques données et les compléter. Une première étape serait de recommencer les manipulations de dosage de l'HA et de PCRs quantitatives sur des échantillons de moelle de taille beaucoup plus petite que celle choisie ici. Une taille de 1mm au lieu de 4 mm devrait être tout à fait correcte et permettrait peut-être de rendre les détections plus sensibles aux variations de présence de l'HA et d'expressions géniques.

Etant donné l'importance du lien entre le rôle et le poids moléculaire de l'HA, une expérimentation intéressante serait d'investiguer les différents types de tailles de fragments d'HA présents dans la moelle avant et après trauma médullaire. Il serait ensuite intéressant de recommencer l'entièreté du protocole avec des individus KO pour les différentes enzymes liées à l'HA. Cette démarche permettrait d'étudier l'aspect de la cicatrice gliale chez ces individus mais aussi de voir si la récupération des capacités physiques se ferait de la même manière chez ces individus avec un métabolisme de l'HA perturbé. Le Hanging wire pourrait néanmoins être abandonné étant donné le caractère peu relevant de la méthode dans notre contexte expérimental. Les résultats pourraient améliorer nos connaissances sur les facteurs bénéfiques à la régénération axonale et fournir des informations importantes pour le développement d'adjuvants à la cicatrisation correcte du tissu médullaire et à la repousse axonale.

## 5. Bibliographie

- 1 Facteurs cellulaires et moléculaires influençant la régénération axonale dans les systèmes nerveux central et périphérique, Benoît Barrette, Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en Physiologie-Endocrinologie, Université de Laval, Québec, Canada, 2008
- 2 PCEM2 en Neurologie et Psychiatrie, Anatomie morphologie, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Paris, France, année universitaire 2012-2013
- 3 Histologie générale II, Pr. Yves Poumay, Laboratoire Cellules et Tissus, Faculté de Médecine Université de Namur, année académique 2011-2012
- 4 Carpenter's Human Neuroanatomy, André Parent, 9<sup>ème</sup> édition, Williams and Wilkins, 1996
- 5 Volterra A and Steinhäuser C (2004), *Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus*, *Glia*, 47(3):249-57
- 6 Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E and Volterra A (2004), *Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate*, *Nat Neurosci.*, 7(6):613-20
- 7 Maeda N (2015) *Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease*, *Front Neurosci.*, 23;9:98
- 8 Gaudet AD and Popovich PG (2014) *Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord*, *Exp Neurol.*, 258:24-34
- 9 Khaing ZZ., Milman BD, Vanscoy JE, Seidlits SK, Grill RJ and Schmidt CE (2011) *High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury*, *J. Neural Eng.*, 8
- 10 Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S and Yong VW (2013) *Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination*, *Nat Rev Neurosci.*, 14(10):722-9
- 11 Takeuchi K, Yoshioka N, Onaga SH, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamra M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H and Igarashi M (2013) *Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 inhibits recovery from neural injury*, *Nat Commun.*, 4:2740
- 12 Handler M, Yurchenco PD and Iozzo RV (1997), *Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis*, *Dev Dyn.*, Oct;210(2):130-45
- 13 Fujikawa K, Yokohama-Tamaki T, Morita T, Baba O, Qin C and Shibata S (2015), *An in situ hybridization study of perlecan, DMP1, and MEPE in developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible and limb bud cartilage*, *Eur J Histochem.*, Sep 25;59(3):2553

- 14 Jones LL, Margolis RU and Tuszynski MH (2003), *The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury*, Exp Neurol., Aug;182(2):399-411
- 15 Fraser JRE, Laurent TC and Laurent UBG (1997) *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*, J Intern Med., 242(1):27-33
- 16 Stern R (2003), *Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?*, Glycobiology vol. 13 no. 12 pp. 105R-115R
- 17 Csoka A B, Frostb G I, Stern R (2001) *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*, Matrix Biology 20, 499-508
- 18 Törrönen K, Nikunen K, Tammi M, Tammi R and Rilla K (2014) *Tissue distribution and subcellular localization of hyaluronan synthase isoenzymes*, Histochem Cell Biol., 141(1):17-31
- 19 Lepore AC, O'Donnell J, Kim AS, Yang EJ, Tuteja A, Haidet-Phillips A, O'Banion CP and Maragakis NJ (2011) *Reduction in expression of the astrocyte glutamate transporter, GLT1, worsens functional and histological outcomes following traumatic spinal cord injury*, Glia., 59(12) : 1996–2005
- 20 Sherman LS, Struve J, Rangwala R, Wallingford NM, Tuohy TF and Kuntz iv C (2002) *Hyaluronate-Based Extracellular Matrix: Keeping Glia in their Place*, GLIA, 38, 93-102
- 21 Tachi Y, Okuda T, Kawahara N, Kato N, Ishigaki Y and Matsumoto T (2015) *Expression of hyaluronidase-4 in a rat spinal cord hemisection model*, Asian Spine J., 9(1):7-13
- 22 Wang J, Wang X, Rong W, Wei F and Liu Z (2014) *Alteration in chondroitin sulfate proteoglycan expression at the epicenter of spinal cord is associated with the loss of behavioral function in Tiptoe walking Yoshimura mice*, Neurochem Res., 39(12):2394-406
- 23 Struve J, Maher CB, Li Y, Kinney S, Fehlings MG, Kuntz iv C and Sherman LS (2005) *Disruption of the hyaluronan-based extracellular matrix in spinal cord promotes astrocyte proliferation*, Glia, 52(1):16-24
- 24 Kundi S, Bicknell R and Ahmed Z (2013) *Spinal cord injury: current mammalian models*, American Journal of Neuroscience, 4 (1): 1-12
- 25 Sharif-Alhoseini M and Rahimi-Movaghar V (2014) *Animal Models in Traumatic Spinal Cord Injury*, Intech
- 26 Reginensi D, Carulla P, Nocentini S, Seira O, Serra-Picamal X, Torres-Espin A, Matamoros-Angles A, Gavin R, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Samitier J, Trepas X, Navarro X and Antonio del Rio J (2015), *Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord*, Cell. Mol. Life Sci., 72:2719–2737

- 27 Tabakow P, Jarmundowicz W, Czapiga B, Fortuna W, Miedzybrodzki R, Czyz M, Huber J, Szarek D, Okurowski S, Szewczyk P, Gorski A and Raisman G (2013), *Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury*, Cell Transplant., 22(9):1591-612
- 28 Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, Qiu M, Gozal D and Liu R (2005), *Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury*, Spinal Cord, 43(4):204-13
- 29 Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K and Petratos S (2004), *Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury*, Neurobiol Dis., 15 (3):415-36
- 30 Tang S, Woodhall RW, Shen YJ, deBellard ME, Saffell JL, Doherty P, Walsh FS and Filbin MT (1997), *Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration*, Mol Cell Neurosci., 9(5-6):333-46
- 31 Marques SA, Ferreira Garcez V, Del Bel EA and Blanco Martinez AM (2009) *A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice : Morphological and functional assessment*, Journal of Neuroscience Methods, 177, 183-193
- 32 Sharif-Alhoseini M and Rahimi-Movaghar V (2014) *Animal Models in Traumatic Spinal Cord Injury*, Intech, ch.10
- 33 Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM and Popovich PG (2006), *Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strain*, Journal of Neurotrauma, V.23, 5, p. 635–659
- 34 Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y and Kohsaka S (2004), *Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity*, J Neurochem., Feb;88(4):844-56
- 35 Pan W, Zhang L, Liao J, Csernus B and Kastin AJ (2003), *Selective increase in TNF alpha permeation across the blood-spinal cord barrier after SCI*, J Neuroimmunol., 134(1-2):111-7
- 36 Yang J, Wang G, Gao C, Shao G and Kang N (2013), *Effects of hyperbaric oxygen on MMP-2 and MMP-9 expression and spinal cord edema after spinal cord injury*, Life Sci., 93(25-26):1033-8
- 37 Nagy JI, Hacking J, Frankenstein UN and Turley EA (1995) *Requirement of the Hyaluronan Receptor RHAMM in Neurite Extension and Motility as Demonstrated in Primary Neurons and Neuronal Cell Lines*, The Journal of Neuroscience, 15(1), 241-252
- 38 Moon LDF, Asher RA and Fawcett JW (2003) *Limited Growth of Severed CNS Axons After Treatment of Adult Rat Brain With Hyaluronidase*, Journal of Neuroscience Research, 71, 23–37
- 39 Xing G, Ren M and Verma A (2014) *Divergent Temporal expression of Hyaluronan Metabolizing Enzymes and Receptors with Craniotomy vs. Controlled-Cortical Impact Injury in Rat Brain: A Pilot Study*, Front Neurol., 5, 173

40 Arranz AM, Perkins KL, Irie F, Lewis DP, Hrabe J, Xiao F, Itano N, Kimata K, Hrabetova S and Yamaguchi Y (2014) *Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space*, J Neurosci., 34(18):6164-76

41 Collins SL, Black KE, Chan-Li Y, Ahn Y-H, Cole PA, Powell JD and Horton MR (2011) *Hyaluronan Fragments Promote Inflammation by Down-Regulating the Anti-inflammatory A2a Receptor*, Am J Respir Cell Mol Biol, Vol 45., pp 675–683

42 Wakao N, Imagama S, Zhang H, Tauchi R, Muramoto A, Natori T, Takeshita S, Yshiguro, Matsuyama Y and Kadomatsu K (2011) *Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats*, Neuroscience Letters, 488, 299-304

43 Torigoe K, Tanaka, HF, Ohkochi H, Miyasaka M, Yamanokuchi H, Yoshidad K, Yoshida T (2011) *Hyaluronan tetrasaccharide promotes regeneration of peripheral nerve: in vivo analysis by film model method*, Brain Res., 1385:87-92

44 Gupta D, Tator CH and Shoichet MS (2006) *Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord*, Biomaterials, 27(11):2370-9

45 UniProt, s.d., *UniProtKB-PA24821 (TENA\_HUMAN)*,  
en ligne <http://www.uniprot.org/uniprot/P24821> ,consulté le 31/10/2015

46 UniProt, s.d., *UniProtKB-Q8BYI9 (TENR\_MOUSE)*,  
en ligne <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8BYI9> , consulté le 31/10/2015

47 UniProt, s.d., *UniProtKB-P14543 (NIDI\_HUMAN)*,  
en ligne <http://www.uniprot.org/uniprot/P14543> , consulté le 31/10/2015

48 UniProt, s.d., *UniProtKB-Q14118 (DAG1\_HUMAN)*,  
en ligne <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14118> , consulté le 31/10/2015

49 UniProt, s.d., *UniProtKB-P16070 (CD44\_HUMAN)*,  
en ligne <http://www.uniprot.org/uniprot/P16070> , consulté le 31/10/2015

50 NCBI, 08/11/2015, *HMMR hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) [ Homo sapiens (human) ]*, en ligne <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3161> , consulté le 10/11/2015

51 UniProt, s.d., *UniProtKB-Q99P72 (RTN4\_MOUSE)*,  
en ligne <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99P72> , consulté le 06/12/2015



52 UniProt, s.d., *UniProtKB-P14136 (GFAP\_HUMAN)*,  
en ligne <http://www.uniprot.org/uniprot/P14136>, consulté le 31/10/2015

53 NCBI, 01/10/2015, Hprt hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase [ *Mus musculus*  
(house mouse) ], en ligne <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/15452>, consulté le 10/11/2015